

Caracterização de sistemas de bombas de efluxo de *Aliarcobacter butzleri*

Ana Rita de Almeida Nunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Coorientadoras: Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues
Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

outubro de 2020

Agradecimentos

Foi sem dúvida um dos anos mais atribulados da minha vida, mas felizmente tive a sorte de poder ter por perto as pessoas certas, que sempre me ajudaram e deram apoio em tudo o que precisei, por isso quero agradecer a todos.

Começo por agradecer à minha orientadora, Doutora Susana Ferreira por me ter deixado integrar no seu grupo de investigação, pela transmissão de conhecimentos, pelos conselhos e dicas para melhorias no meu trabalho, mas acima de tudo pela compreensão e paciência que teve comigo ao longo desta dissertação. Agradeço também às minhas coorientadoras, Doutora Fernanda Domingues e Doutora Mónica Oleastro por todo o apoio e disponibilidade ao longo deste tempo.

À Universidade da Beira Interior, agradeço por me ter acolhido ao longo destes seis anos de percurso académico, bem como ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde por me ter proporcionado a execução deste trabalho.

No laboratório, quero agradecer ao Doutor Ângelo Luís por todo o apoio e disponibilidade em ajudar, bem como aos meus amigos e colegas, nomeadamente ao Igor, à Carolina, ao Rodrigo, à Alexandra e à Cristiana que me proporcionaram um ano de risadas e companheirismo, bem como discussões e desentendimentos que se tornavam a alegria do nosso dia.

Aos meus amigos, tenho um obrigada gigante a cada um deles. Começo por agradecer à Carla e à Mariana por serem parte da minha costela. À Laura e Maria por terem iniciado esta aventura comigo. Aos meus padrinhos de faculdade Sérgio e Rita, tenho as melhores referências de estudantes, profissionais e acima de tudo de pessoas. Aos meus amigos, Rita, Alex, Tiago, Valente, Zini e Cláudio, um agradecimento especial porque isto sem eles nunca teria o mesmo encanto. Aos meus super colegas de casa Rafa, Ana, João Martins e João Diogo, quero agradecer por toda a paciência e familiaridade que tiveram comigo. E por fim, às minhas parfonetes, Vânia, Beatriz e Ângela que no último ano tiveram um papel fundamental na minha vida. Agradeço também a uma pessoa muito especial para mim, que me tem apoiado imenso, e que à sua maneira tem estado sempre comigo nestes últimos 3 anos.

Por fim, e sendo eles o pilar de tudo isto, e da minha vida quero agradecer à minha família, por todos os valores e amor que me transmitem diariamente. Tudo o que sou hoje devo-lhes a eles, tanto a nível pessoal como a nível académico. Obrigada ao amor da minha vida, a minha mãe que tem a maior paciência comigo, e que me demonstra todos os dias o significado da palavra amor.

Quero dedicar esta dissertação aos meus avós, em especial ao meu avô João que nos deixou fisicamente este ano. Sei que apesar de não estar presente me tem ajudado muito, e decerto que está muito orgulhoso de mim neste momento.

Resumo

Aliarcobacter butzleri é um enteropatogéneo emergente reconhecido como a quarta espécie mais comum em amostras diarreicas entre os *Campylobacter-like organisms*, encontrando-se na lista de microrganismos considerados um perigo grave para a saúde humana, pela Comissão Internacional em Especificações Microbiológicas para Alimentos. Este organismo patogénico é conhecido por apresentar múltipla resistência a antibióticos, podendo assim originar um problema no tratamento de infeções causadas por esta bactéria. Informação prévia acerca desta bactéria sugere que a mesma contém diversos sistemas putativos de efluxo que permanecem por caracterizar, e que poderão ter um papel relevante como mecanismos de resistência a antimicrobianos. Assim, com este trabalho pretendeu-se estudar o papel de cinco sistemas de efluxo distintos, todos da família "*Resistance nodulation cell division*". Para tal, o estudo foi iniciado com construção de mutantes de *A. butzleri*, utilizando uma estirpe naturalmente transformável (AB28/11), através da interrupção dos genes codificantes da proteína de membrana interna responsável pelo reconhecimento do substrato. Dos cinco sistemas em estudo só foi possível gerar mutantes para três, onde se procedeu à interrupção dos genes *areB*, *areE* e *areG*, correspondentes às bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, respetivamente. A construção dos mutantes foi confirmada pela técnica de "*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*". Posteriormente, foram realizados uma série de testes para comparação entre os mutantes e a estirpe parental. Quanto ao crescimento bacteriano não foram observadas diferenças significativas entre estirpes. De seguida, foi avaliada a contribuição de cada sistema de efluxo em estudo para a resistência a antibióticos, sais biliares e biocidas, pela determinação da concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição. Os resultados mostram que: a inativação do gene *areG* teve um impacto na resistência a cinco das seis classes de antibióticos testadas, bem como na resistência a diversos biocidas; a inativação do gene *areB* teve um impacto na resistência às cefalosporinas, estreptomicina, fluoroquinolonas e macrólidos; o perfil fenotípico de resistência do mutante AB28/11 Δ *areE* foi semelhante à estirpe parental. Para além disso, procedeu-se à avaliação do papel do sistema de efluxo na acumulação intracelular de compostos, usando um método de fluorescência, que avaliou a acumulação de brometo de etídio, nas estirpes parental e mutantes. Esta avaliação demonstrou que a bomba AreABC apresenta um papel importante na extrusão de compostos tóxicos, visto que se observou uma maior acumulação de brometo de etídio do que a observada para a estirpe parental, demonstrando uma menor atividade global dos sistemas de efluxo das células. Em suma, com este trabalho foi possível caracterizar o papel dos sistemas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI na resistência de *A. butzleri*, tendo-se destacado o potencial papel dos sistemas AreABC e AreGHI para a multirresistência desta bactéria.

Palavras-chave

Aliarcobacter butzleri; Sistemas de efluxo; Resistência; Antibióticos

Abstract

Aliarcobacter butzleri is an emerging enteropathogen recognized as the fourth most common species in diarrheal samples among the *Campylobacter*-like organisms, being on the list of microorganisms considered to be a serious hazard to human health according to the International Commission on Microbiological Specifications for Food. This pathogenic organism is known to be multidrug resistant, which may cause complications in the treatment of infections caused by this bacterium. Previous studies regarding this bacterium suggest that it contains several putative efflux systems that remain to be characterized, and these may have a relevant role as mechanisms of resistance to antimicrobials. This study aimed to evaluate the role of five different efflux systems from the Resistance nodulation cell division pump family. To this end, the study started with the construction of *A. butzleri* mutants, using a naturally transformable strain (AB28/11), by interrupting the genes coding for the inner membrane protein responsible for substrate recognition. From the five systems under study, it was only possible to generate mutants for three of them, where the genes *areB*, *areE* and *areG*, from the AreABC, AreDEF and AreGHI efflux pumps, respectively, were interrupted. The construction of the mutants was confirmed by the technique of reverse transcription-polymerase chain reaction. Subsequently, a series of tests were carried out to compare the mutants and the parental strain. As for bacterial growth, no significant differences were observed among strains. Then, the contribution of each efflux system under study for resistance to antibiotics, bile salts and biocides was evaluated, by determining the minimum inhibitory concentration through the microdilution method. Following this, the results showed that: inactivation of the *areG* gene had an impact on resistance to five of the six classes of antibiotics tested, as well as on the resistance to several biocides; the inactivation of the *areB* gene had an impact on resistance to cephalosporins, streptomycin, fluoroquinolones and macrolides; the resistance phenotype of the mutant AB28/11 Δ areE was similar to the one of the parental strain. In addition, the role of the efflux system in the intracellular accumulation of compounds was evaluated using a fluorescence method, which evaluated the accumulation of ethidium bromide, in parental and mutant strains. This assay showed that the pump AreABC provides an important role in the extrusion of toxic compounds, since a higher accumulation than the observed for the parental strain was observed, showing a reduced global activity of the efflux systems. In sum, with this work we were able to characterize the role of the AreABC, AreDEF and AreGHI pumps in the resistance of *A. butzleri*, focusing on the potential role of the AreABC and AreGHI systems on multidrug resistance of this bacterium.

Keywords

Aliarcobacter butzleri; RND efflux pumps; Resistance; Antibiotics.

Índice

1.	Capítulo – Introdução	1
1.1.	Género previamente designado de <i>Arcobacter</i>	1
1.1.1.	Classificação e taxonomia do género anteriormente designado de <i>Arcobacter</i>	3
1.1.2.	Características gerais de <i>Aliarcobacter</i>	4
1.1.2.1.	Características gerais de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	5
1.1.3.	Patogenicidade e virulência em <i>Aliarcobacter butzleri</i>	5
1.1.4.	<i>Aliarcobacter butzleri</i> na cadeia alimentar e suas vias de transmissão	7
1.1.4.1.	Consumo de alimentos contaminados	7
1.1.4.2.	Consumo de águas contaminadas	9
1.1.4.3.	Transmissão por contacto com animais domésticos	10
1.1.4.4.	Transmissão entre humanos	11
1.1.5.	Resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a antibióticos	11
1.1.5.1.	Mecanismos de resistência bacteriana	13
1.1.6.	Sistemas bacterianos de efluxo	15
1.1.6.1.	Bombas de efluxo da família “Resistance Nodulation Cell Division”	18
1.1.6.2.	Potenciais mecanismos de resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	20
2.	Capítulo – Objetivos	23
3.	Capítulo - Materiais e Métodos	25
3.1.	Estirpe <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB28/11	25
3.1.1.	Armazenamento e preparação das estirpes	25
3.1.2.	Construção dos mutantes de efluxo de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	26
3.1.2.1.	Extração de DNA genómico de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	26
3.1.2.2.	Obtenção dos fragmentos de DNA transformantes	26
3.1.2.2.1.	Extração do plasmídeo pUC18-K2 de <i>E. coli</i>	27
3.1.2.2.2.	Digestão do plasmídeo pUC18-K2	27
3.1.2.2.3.	Purificação da cassette <i>aphA-3</i>	28
3.1.2.2.4.	Amplificação dos fragmentos hibridizantes com a cassette <i>aphA-3</i>	28
3.1.2.2.5.	Ligação dos fragmentos hibridizantes com a cassette <i>aphA-3</i>	30
3.1.3.	Transformação natural de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	32
3.1.3.1.	Transformação natural em meio bifásico	32
3.1.3.2.	Transformação natural em meio sólido	32
3.1.4.	Verificação da mutagénese	33
3.1.4.1.	Confirmação da inserção do fragmento de DNA transformante	33
3.1.4.2.	Confirmação da expressão do gene	34
3.1.4.2.1.	Extração de RNA Total	34
3.1.4.2.2.	Digestão com DNase I das amostras de RNA Total	35
3.1.4.2.3.	Síntese de DNA complementar (cDNA)	35

3.1.4.2.4.	Determinação da expressão genética dos diferentes mutantes	35
3.1.5.	Determinação das curvas de crescimento das estirpes mutantes e da estirpe parental	36
3.1.6.	Avaliação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos	37
3.1.7.	Determinação da concentração mínima inibitória	39
3.1.8.	Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio	39
4.	Capítulo - Resultados e discussão	41
4.1.	Construção de mutantes	41
4.2.	Efeito da inativação dos diferentes genes no crescimento bacteriano da estirpe AB28/11 de <i>A. butzleri</i>	46
4.3.	Avaliação da concentração mínima inibitória para as estirpes parental e mutantes	48
4.4.	Ensaio de acumulação de brometo de etídio	56
5.	Capítulo - Conclusões	59
6.	Capítulo - Perspetivas futuras	61
	Referências bibliográficas	63

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação dos mecanismos de resistência a antibióticos numa bactéria Gram-negativo. a) Diminuição do influxo, isto é a diminuição da entrada do antibiótico na célula (representadas pelos quadrados azuis); b) Aumento do efluxo, devido às bombas de efluxo que secretam antibióticos da célula, sendo que alguns transportadores, como os da família “*Resistance Nodulation Cell Division*” (representado a rosa), podem bombear antibióticos diretamente para fora da célula, enquanto outros, como os que estão representados a vermelho secretam no periplasma; c) Modificação do alvo, através de mutações que modificam a proteína alvo; d) Modificação do antibiótico, que pode ocorrer por modificação ou degradação do antibiótico. Figura adaptada de Allen *et al.* (2010)14

Figura 2 - Ilustração esquemática, que mostra as cinco das seis superfamílias de bombas de efluxo encontradas em bactérias, bem como os seus mecanismos de acoplamento de energia. ME, membrana externa; MI, membrana interna. Imagem adaptada (Alav, Sutton, and Rahman 2018)16

Figura 3 – Representação do repertório de genes relacionados a sistemas de efluxo e outros determinantes de resistência a antibióticos identificados no genoma de 49 estirpes em *A. butzleri*.21

Figura 4 - Representação esquemática dos operões dos sistemas de efluxo em estudo, denominados de (a) AreABC, (b) AreDEF, (c) AreGHI, (d) AreJKLM e (e) AreNOP. A azul estão marcados os genes putativos que codificam para a proteína de membrana interna da bomba de efluxo.26

Figura 5 - Representação esquemática da digestão do plasmídeo pUC18-K2, com os locais de corte pelas enzimas KpnI e BamHI obtendo-se a cassette *aphA-3*.27

Figura 6 - Representação esquemática da construção do fragmento transformante pela ligação da cassette que confere resistência à canamicina com as regiões a jusante do codão de iniciação (fragmento A) e a montante do codão de stop (fragmento B). Esta representação é aplicada aos genes *areB*, *areG*, *areLM* e *areN*.30

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose que demonstra a extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*. (M: Marcador de pesos molecular GRS Universal Ladder, 1 – pUC18-K)42

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose de: (a) produtos da digestão do plasmídeo pUC18-K2, com as enzimas BamHI e KpnI. (M: Marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1-5: produtos da digestão do plasmídeo pUC18-K2, onde a seta aponta para a cassette *aphA-3*; (b) cassette *aphA-3* purificada (M: Marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1: cassette *aphA-3*)42

Figura 9 - Eletroferese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR correspondentes ao fragmento da região a jusante do codão de iniciação e a montante do codão de stop dos diferentes genes. (a) gene *areB* (1: Controlo negativo do fragmento A; 2 e 3: fragmento A e B, respetivamente; 4: Controlo negativo do fragmento B; M: Marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder); (b) gene *areG* (1: Controlo negativo do fragmento A; 2 e 3: fragmento A e B, respetivamente; 4: Controlo negativo do fragmento B); (c) gene *areLM* (1: fragmento A; 2: Controlo negativo do fragmento A; 3: fragmento B; 4: Controlo negativo do fragmento B). (d) gene *areN* (1: fragmento A; 2: Controlo negativo do fragmento A; 3: fragmento B; 4: Controlo negativo do fragmento B))43

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose representativa do fragmento obtido pela junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*. (a) 1. fragmento de DNA transformante *areB*; (b) 1. fragmento de DNA transformante *areG*; (c) 1. fragmento de DNA transformante *areLM*, 2. fragmento de DNA transformante *areN*. M: Marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder.....44

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação de PCR do gDNA da estirpe parental de *A. butzleri* e dos mutantes. (a) PCR de confirmação do mutante AB28/11Δ*areB* (1: Fragmento amplificado a partir da estirpe parental; 2: Fragmento amplificado a partir do mutante AB28/11Δ*areB*); (b) PCR de confirmação do mutante AB28/11Δ*areG* (1: Fragmento amplificado a partir da estirpe parental; 2: Fragmento amplificado a partir do mutante AB28/11Δ*areG*). M: Marcador de peso molecular.....45

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos do RT-PCR da estirpe parental e dos mutantes. (1: amplificação do cDNA da estirpe parental do gene *areB*; 2: amplificação do cDNA do mutante AB28/11Δ*areB*; 3: controlo negativo; 4: amplificação do cDNA da estirpe parental do gene *areE*; 5: amplificação do cDNA do mutante AB28/11Δ*areE*; 6: controlo negativo; 7: amplificação do cDNA da estirpe parental do gene *areG*; 8: amplificação do cDNA do mutante AB28/11Δ*areG*; 9: controlo negativo; M: Marcador de pesos moleculares.....46

Figura 13 - Perfil de crescimento das estirpes de AB28/11 parental e mutadas AB28/11Δ*areB*, AB28/11Δ*areE* e AB28/11Δ*areG*.....47

Figura 14 - Acumulação de brometo de etídio pela estirpe parental e as estirpes mutadas na concentração de 1 µg/mL.....57

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Espécies do previamente designado género *Arcobacter*. até ao momento propostas e reconhecidas, bem como o seu ano e local de isolamento.....2

Tabela 2 - Sequências e tamanho (pb) dos oligonucleótidos iniciadores, com as suas respetivas temperaturas de hibridização e o tamanho do fragmento amplificado (pb).....27

Tabela 3 - Temperatura de hibridização ótima para a ligação dos fragmentos hibridizantes à cassete de cada mutante e o tamanho do fragmento (pb).....31

Tabela 4 - Sequência dos oligonucleótidos iniciadores usados para as reações de RT-PCR, a sua temperatura de hibridização (°C) e o tamanho do fragmento (pb).....37/38

Tabela 5 – Identificação dos antimicrobianos, sais biliares e biocidas para a determinação da concentração mínima inibitória, bem como as marcas dos mesmos, o seu grau de pureza e o solvente usado para a sua diluição.....38

Tabela 6 - Concentração mínima inibitória de agentes antimicrobianos, como antibióticos, sais biliares, desinfetante e germicidas para a estirpe parental, e respetivos mutantes.....49

Lista de Acrónimos

ABC	Do inglês “ <i>Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette</i> ”
ATP	Do inglês “ <i>Adenosine Triphosphate</i> ”
BA	Do inglês “ <i>Blood Agar</i> ”
BHI	Do inglês “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”
pb	Pares de bases
cDNA	DNA complementar
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DO	Densidade Ótica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
BrEt	Brometo de etídio
gDNA	DNA genômico
ICMF	Do inglês “ <i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> ”
LB	Do inglês “ <i>Luria-Bertani</i> ”
MATE	Do inglês “ <i>Multidrug And Toxic compound Extrusion</i> ”
MDR	Do inglês “ <i>Multidrug Resistance</i> ”
MFS	Do inglês “ <i>Major Facilitator Superfamily</i> ”
NaCl	Cloreto de Sódio
PACE	Do inglês “ <i>Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux</i> ”
PBS	Do inglês “ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ”
PCR	Do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
RNA	Ácido ribonucleico
RND	Do inglês “ <i>Resistance-Nodulation-Division cell</i> ”
RT-PCR	Do inglês “ <i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i> ”
SMR	Do inglês “ <i>Small Multidrug Resistance</i> ”
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	Do inglês “ <i>Terrific Broth</i> ”
TSA	Do inglês “ <i>Tryptic Soy Agar</i> ”
TSB	Do inglês “ <i>Tryptic Soy Broth</i> ”
UFC	Unidades formadoras de colônias

1. Capítulo – Introdução

1.1. Evolução do género *Arcobacter*

Em 1977, Ellis e coautores isolaram, pela primeira vez, uma bactéria que mais tarde foi atribuída ao género *Arcobacter*, sendo que na época apenas foram identificados como organismos de Gram-negativo espiralados, recolhidos de fetos de suínos e bovinos (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2017a). Estes isolados foram classificados inicialmente como *Campylobacter* aerotolerante, e só posteriormente como *Campylobacter cryaerophilus* (Neill et al. 1985). Em 1983, McClung et al., isolaram uma nova espécie a partir de raízes de *Spartina alterniflora* Loisel e de sedimentos associados a um pântano, sendo esta espécie designada de *Campylobacter nitrofigilis* (McClung, Patriquin, and Davis 1983). No ano de 1991, Kiehlbauch et al. isolaram uma nova espécie proveniente de fezes humanas e animais, designando-a de *Campylobacter butzleri* (Kiehlbauch et al. 1991). No ano seguinte, em 1992 Vandamme e seus colaboradores, após uma nova análise genómica de *Campylobacter*, sentiram a necessidade de criar uma nova espécie, propondo também nessa altura a introdução de um novo género, sendo esse designado de *Arcobacter*, que englobava as espécies anteriormente designadas, nomeadamente *C. nitrofigilis*, *C. cryaerophilus*, e *C. butzleri* (Vandamme, Vancanneyt, et al. 1992).

Após a descoberta das espécies anteriormente referidas, foi isolada uma nova espécie a partir de fluidos corporais de touros, e em abortos e fezes de bovinos, suínos e ovinos, sendo designada de *Arcobacter skirrowii* (Vandamme, Vancanneyt, et al. 1992). Em 2005, duas novas espécies foram introduzidas neste género, nomeadamente *Arcobacter cibarius*, isolada a partir de carcaça de frango, na Bélgica, e *Arcobacter halophilus*, encontrada numa lagoa hipersalina, no Hawai, USA (Donachie et al. 2005; Houf et al. 2005). Estas duas espécies foram incorporadas ao género *Arcobacter*, devido à similaridade do gene 16S rRNA (Pérez-Cataluña, Salas-Massó, et al. 2018).

Em 2017 eram já 27 as espécies identificadas, sendo de referir que praticamente todos os anos era reconhecida uma nova espécie. Atualmente são reconhecidas 30 diferentes espécies do previamente designado género *Arcobacter*, como se pode ver pela tabela 1, que indica a espécie identificada, o ano, o local e o autor do seu isolamento.

Tabela 1 - Espécies do previamente designado género *Arcobacter* até ao momento propostas e reconhecidas, bem como o seu ano e local de isolamento.

Espécie	Ano	Origem do isolado	Local	Referência
<i>A. cryaerophilus</i>	1977	Fetos Bovinos	Irlanda do Norte	(Ellis et al. 1978)
<i>A. nitrofigilis</i>	1983	Raízes de <i>Spartina alterniflora</i>	USA	(McClung et al. 1983)
<i>A. butzleri</i>	1991	Amostras de fezes diarreicas	USA	(Kiehlbauch et al. 1991)
<i>A. skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	Bélgica	(Vandamme et al. 1992)
<i>A. cibarius</i>	2005	Carcaças de frango	Bélgica	(Houf et al. 2005)
<i>A. halophilus</i>	2005	Lagoa hipersalina	USA	(Donachie et al. 2005)
<i>A. mytili</i>	2009	Mexilhão e água salobra	Espanha	(Collado, Cleenwerck, et al. 2009)
<i>A. thereius</i>	2009	Porcos e Patos	Bélgica	(Houf et al. 2009)
<i>A. marinus</i>	2011	Água do mar	Coreia	(Kim, Hwang, and Cho 2010)
<i>A. trophiarum</i>	2011	Porcos de engorda	Bélgica	(De Smet et al. 2011)
<i>A. defluvii</i>	2011	Águas residuais	Espanha	(Collado, Levican, et al. 2011)
<i>A. molluscorum</i>	2011	Mariscos	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. ellisii</i>	2011	Mexilhões	Espanha	(Figueras et al. 2011)
<i>A. bivalviorum</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levican et al. 2012)
<i>A. venerupis</i>	2012	Mexilhões e amêijoas	Espanha	(Levican et al. 2012)
<i>A. anaerophilus</i>	2013	Estuário	Índia	(Sasi Jyothsna et al. 2013)
<i>A. cloacae</i>	2013	Esgoto	Espanha	(Levican, Collado, and Figueras 2013)
<i>A. suis</i>	2013	Porco	Espanha	(Levican, Collado, et al. 2013)
<i>A. ebronensis</i>	2014	Mexilhões	Espanha	(Levican et al. 2015)
<i>A. aquimarinus</i>	2014	Água do mar	Espanha	(Levican et al. 2015)
<i>A. lanthieri</i>	2015	Estrume de suínos e bovinos	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2015)
<i>A. pacificus</i>	2015	Água do mar	China	(Zhang et al. 2016)
<i>A. faecis</i>	2016	Águas residuais	Canadá	(Whiteduck-Léveillé et al. 2016)
<i>A. acticola</i>	2016	Água do mar	Coreia do Sul	(Park et al. 2016)
<i>A. lekithochrous</i>	2017	Moluscos	Noruega	(Diéguez et al. 2018)
<i>A. canalis</i>	2018	Canais de água	Espanha	(Pérez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2018)
<i>A. caeni</i>	2019	Água	Espanha	(Perez-Cataluña, Salas-Massó, and Figueras 2019)
<i>A. lacus</i>	2019	Água	Espanha	(Perez-Cataluña et al. 2019)
<i>A. peruensis</i>	2019	Água costeiras e sulfúricas	Peru	(Callbeck et al. 2019)
<i>A. vitoriensis</i>	2020	Cenoura e águas residuais	Espanha	(Alonso et al. 2020)

1.1.1. Classificação e taxonomia do género anteriormente designado de *Arcobacter*

Se inicialmente se sentiu uma necessidade de separar o género *Arcobacter* do género *Campylobacter*, recentemente e devido à dificuldade em se fazer uma análise filogenética baseada apenas num único gene (*16S rRNA*), e atendendo a que *Arcobacter* spp. pode ser encontrado em diversos habitats e hospedeiros, tornando-o num género bastante diversificado, levou a que surgissem algumas questões entre a comunidade científica acerca da classificação e taxonomia deste género.

Desta forma, em 2017 Waite e seus colaboradores devido à necessidade de rever a posição taxonómica de *Arcobacter*, sugeriram que esta bactéria pudesse vir a pertencer à classe *Campylobacteriia*, família *Arcobacteraceae* nov., da ordem *Campylobacteriales*, e do filo *Epsilonbacteraeota* phyl. nov., no entanto, a sua proposta não foi ainda validada (Waite et al. 2017).

Assim, no ano seguinte Pérez-Cataluña e seus colaboradores, procederam à reavaliação taxonómica das espécies de *Arcobacter*, identificando uma variabilidade genómica abundante, que conjuntamente com uma combinação de diferentes características fenotípicas do género *Arcobacter*, dividia-o em pelo menos seis diferentes géneros, e um candidato, sendo estes os seguintes: *Arcobacter* gen. nov., *Aliarcobacter* gen. nov., *Pseudarcobacter* gen. nov., *Halarcobacter* gen. nov., *Malaciobacter* gen. nov., *Poseidonibacter* gen. nov., e o novo género candidato *Arcomarinus* (Pérez-Cataluña et al., 2018a; Pérez-Cataluña et al., 2018b). Posto isto, o género *Arcobacter* apenas é composto por uma espécie, *A. nitrofigilis*. O género *Aliarcobacter* compreende *A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. thereius*, *A. trophiarum*, *A. lanthieri* e *A. faecis*. Já o género *Pseudarcobacter* inclui a espécie *P. defluvi*, *P. ellisii*, *P. venerupis*, *P. cloacae*, *P. suis*, *P. aquimarinus* e *P. acticola*. O género *Malaciobacter* é composto por quatro diferentes espécies, nomeadamente *M. halophilus*, *M. mytili*, *M. marinus*, *M. molluscorum* e *M. pacificus*. Enquanto que o género *Halarcobacter* compõe-se por *H. bivalviorum*, *H. anaerophilus* e *H. ebronensis*. Finalmente, o género *Poseidonibacter* apenas é constituído por *P. lekithochrous* (Pérez-Cataluña et al., 2018a). Esta nomenclatura foi recentemente reconhecida, no entanto, há autores que não estão de acordo com esta reestruturação taxonómica de *Arcobacter*, como é o caso de On e seus colaboradores, que argumentam que no trabalho de Pérez-Cataluña et al., 2018a não foram incluídos outros géneros de *Epsilonproteobacteria* tendo-se procedido a uma comparação intragénero, que indica, segundo estes autores que a avaliação taxonómica de *Arcobacter* foi pouco abrangente do ponto de vista filogenómico, não apresentando evidências que justifiquem a divisão do género *Arcobacter* (On et al. 2020).

Portanto, considerando as divergências encontradas relativas à taxonomia desta bactéria, durante esta dissertação será usada a nomenclatura apresentada por Pérez-Cataluña et al., 2018, sendo que esta é a reconhecida neste momento e designar por género anteriormente designado de *Arcobacter* quando se referir ao global. Deste modo, *Aliarcobacter butzleri* será correspondente à de Vandamme, et al., 1992b, tal como é referenciado no artigo de Pérez-Cataluña et al., 2019.

1.1.2. Características gerais de *Aliarcobacter*

Aliarcobacter são bacilos de Gram-negativo curvados, em forma de S, ou helicoidal (Sasi et al. 2013). O facto de ser uma bactéria de Gram-negativo, confere ao microrganismo uma complexidade elevada, relativamente à parede celular, sendo constituída por uma membrana externa, espaço periplasmático, e por uma membrana interna (Willey, Sherwood, and Woolverton 2007). A membrana externa é composta por lipossacarídeos, e proteínas, como porinas. Seguindo-se uma camada de peptidoglicano, e a membrana interna, que é constituída por fosfolípidos e proteínas integrais. Estes três complexos podem ser atravessados por bombas de efluxo, que terão como papel fundamental o transporte de toxinas e antimicrobianos para fora do microrganismo (Willey et al. 2007).

As dimensões de *Aliarcobacter* variam entre 0,2 a 0,5 µm de largura, e entre 1 a 3 µm de comprimento (Pérez-Cataluña, et al. 2018a). Não formam esporos, e a sua motilidade deve-se a um único flagelo polar (Sasi Jyothsna et al. 2013). É um microrganismo quimioorganotrófico, com oxidase e catalase positiva. O nitrato, geralmente é reduzido a nitrito, é positivo para a hidrólise de indoxil acetato, e variável para a urease. Não fermenta carboidratos, e não produz pigmentos fluorescentes (Pérez-Cataluña et al. 2019; Pérez-Cataluña, et al. 2018a).

Relativamente ao seu crescimento, ocorre a uma temperatura que varia entre os 15 ° e 42 °C, no entanto na presença de NaCl a 4% e de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,04%, m/V) ou glicina (1% m/V) este não é observado. Algumas espécies podem crescer na presença de safranina (0,05% m/V) ou oxgall (1% m/V) (Pérez-Cataluña et al. 2019).

Quando se trata do pH ótimo de crescimento, *Aliarcobacter* apresenta crescimento num amplo intervalo de pH, que pode variar entre 5,5 e 8,0, sendo que apresentam um maior crescimento a um pH de 6,0 a 7,5 (Cervenka 2007).

Quanto à composição de bases do DNA, esta é constituída por uma percentagem que varia entre 26,4 a 29,4 % mol de G+C (Pérez-Cataluña et al. 2019).

1.1.2.1. Características gerais de *Aliarcobacter butzleri*

O género *Aliarcobacter* é então constituído por oito diferentes espécies, sendo que entre elas é comum que haja diferenças, tanto a nível das condições ótimas de crescimento, como a nível de efeitos no hospedeiro. Como o presente estudo se direciona para *A. butzleri*, serão abordadas em pormenor algumas das características dessa espécie.

Atendendo às características mencionadas anteriormente, *A. butzleri* apresenta um crescimento ideal entre os 15 °C e os 37 °C (Cervenka 2007). Num estudo com a estirpe *A. butzleri* NCTC 12481, verificou-se que acima dos 37 °C há um decréscimo significativo na taxa de crescimento, sendo que aos 40 °C não se deteta nenhum tipo de crescimento (Hilton et al. 2001). É ainda de referir, que este microrganismo cresce bem em meio de Blood Agar (BA), em meio Tryptone Soy Agar (TSA) ou Tryptone Soy Broth (TSB) (Salas-Massó et al. 2016).

O pH ótimo de crescimento para *A. butzleri* varia entre 6,0 e 8,0, a uma temperatura ideal de 30 °C (Hilton et al. 2001).

Relativamente à atividade enzimática desta espécie, esta é determinada por diferentes características fenotípicas. Assim, *A. butzleri* tem uma probabilidade de 95 % ou mais das estirpes desta espécie serem catalase positiva e urease variável, com regularidade de ser negativa. Já o teste de produção de H₂S, este é negativo, e a redução de nitrato e hidrólise do indoxil acetato é positivo (Vandamme, et al., 1992b).

1.1.3. Patogenicidade e virulência em *Aliarcobacter butzleri*

As patologias causadas por bactérias são um grave problema para a saúde pública, particularmente aquelas que são transmitidas por alimentos ou águas (Shah et al. 2011). Neste âmbito, *A. butzleri* surge como um organismo patogénico emergente, causador de diversas doenças transmitidas por alimentos, razão pela qual foi considerado como um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) 2002).

A. butzleri é uma bactéria patogénica emergente que pode ser isolada de animais, alimentos e meio ambiente, e que não pertence à flora intestinal normal em animais e em humanos, encontrando-se associada a infeções nestes seres vivos (Ferreira et al. 2017a; Jiang et al. 2010; Rathlavath, et al. 2017a). Até há pouco tempo, apenas *A. butzleri*, *A. skirrowii* e *A. cryaerophilus*, eram descritas como espécies patogénicas isoladas de humanos, associadas normalmente, a enterites e a bacteremias (Ferreira et al. 2017a; Rathlavath, et al. 2017a). No entanto, já foi também possível isolar *A. thereius* de fezes, em pacientes humanos diagnosticados com enterite (Van den Abeele et al. 2014).

A. butzleri pode causar diarreias severas, enterites e bacteremias em humanos (Collado et al. 2010; Ferreira et al. 2016; González, Suski, and Ferrús 2010). No caso dos sintomas associados a infecção por esta bactéria serem muito agudos e duradouros, poderá ser necessário recorrer a um tratamento com antibiótico apesar deste tipo de infecções ser normalmente autolimitada. No entanto, tem de se considerar o facto de esta bactéria ser caracterizada pelas suas estirpes poderem ser multirresistentes a antimicrobianos (Fanelli et al. 2020).

Aquando da sequenciação do genoma total *A. butzleri* RM4018, Miller et al. (2007) conseguiu-se identificar fatores putativos de virulência, sendo que alguns deles apresentavam homologia com os elementos de virulência de *Campylobacter jejuni* (Ferreira et al. 2016; Miller et al. 2007). Assim, são nove os genes putativos de virulência mais frequentemente estudados, nomeadamente, *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *hecA*, *hecB*, *irgA*. Estes são homólogos a genes associados à patogenicidade em outros organismos intimamente relacionados, indicando o seu potencial papel na virulência em infecções causadas em humanos e animais por *A. butzleri*. Desta forma, sugere-se que entre estes genes de virulência, os genes *cadF* e *cj1349* codifiquem para proteínas da membrana externa, que promovem o contacto celular pela adesão à fibronectina (Ferreira et al. 2014; Ferreira et al. 2016; Miller et al. 2007; Zambri et al. 2019). É de destacar, também o gene *hecA*, que codifica uma proteína pertencente a uma classe de adesinas, que tem um papel importante em vários patogénicos de animais e plantas, e o gene *hecB* que codifica para uma proteína relacionada com a ativação de hemolisina (Ferreira et al. 2016; Miller et al. 2007). Já o gene *irgA* codifica para uma proteína de membrana externa, que é regulada pelo ferro, enquanto que o gene *mviN* codifica para uma proteína envolvida na síntese de peptidoglicano. A fosfolipase A e a exotoxina hemolisina A são codificadas pelos genes *pldA* e *tlyA*, respetivamente (Zambri et al. 2019).

Atualmente, ainda há poucos estudos relativamente aos mecanismos de patogenicidade associados a *Aliarcobacter*, no entanto, estudos *in vitro*, usando linhas celulares humanas e animais, têm demonstrado que são várias as espécies deste género que têm a capacidade de aderir e invadir células eucarióticas, podendo produzir toxinas que danificam as células hospedeiras (Doudah et al. 2012; Ferreira et al. 2016; Karadas et al. 2013; Levican, et al. 2013). É de realçar que a adesão é um fator importante na patogenicidade bacteriana, pois é o passo que estabelece a infecção, seguida pela colonização de tecidos e, em alguns casos, pela invasão bacteriana das células hospedeiras, podendo seguir para a multiplicação intracelular, e consequentemente para a sua disseminação para outros tecidos (Pizarro-Cerdá and Cossart 2006).

De forma a elucidar o impacto de *A. butzleri* na função da barreira epitelial do intestino, com repercussão na diarreia causada pela mesma, Bückner et al. (2009) usaram uma linha celular de carcinoma do colón humano, nomeadamente HT-29/B6, demonstrando que este agente patogénico tem a capacidade de alterar as proteínas de junção e induzir a apoptose epitelial, provocando o fluxo de vazamento de diarreia. Por conseguinte ficou demonstrada a capacidade

deste microrganismo aderir e invadir esta linha celular (Bücker et al. 2009). Um outro estudo, também ele realizado com linhas celulares do intestino humano, nomeadamente células Caco-2 e HT-29, mostrou que dos seis isolados de *A. butzleri* estudados, todos apresentaram capacidade de adesão e invasão nas células Caco-2, enquanto que apenas quatro apresentaram capacidade de adesão às células HT-29, e três invadiram esta mesma linha celular, concluindo que a virulência desta espécie depende da estirpe em questão (Karadas et al. 2013). Nesse mesmo ano, um estudo também ele realizado com células Caco-2 intestinais humanas, indicou que das cinco estirpes de *A. butzleri* em estudo todas elas aderiram e invadiram estas linhas celulares (Levican, et al. 2013). Um outro estudo, realizado em 2014, que envolvia a utilização da linha celular Caco-2 com o intuito de relatar a capacidade de adesão e invasão de *A. butzleri* a estas células, demonstrou que uma inflamação pré-existente não teria efeito significativo na capacidade de adesão. Observou-se ainda que isolados de *A. butzleri* foram capazes de sobreviver no espaço intracelular destas células, e induzir uma regulação positiva, isto é, estimularam a capacidade de secreção de interleucina-8, mediador de resposta imune, destacando o seu potencial patogénico (Ferreira et al. 2014).

1.1.4. *Aliarcobacter butzleri* na cadeia alimentar e suas vias de transmissão

Como já foi dito anteriormente, *A. butzleri* é um agente patogénico emergente, frequentemente encontrado na distribuição global da cadeia alimentar, tornando-o num potencial microrganismo causador de problemas para a saúde pública devido ao consumo de águas e alimentos contaminados. Além disso, sabe-se que é um patogénico resistente em condições de stress, razão pela qual pode sobreviver nos alimentos durante o seu processamento e armazenamento (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019). Esta é uma bactéria cujas potenciais vias de transmissão podem ser fecal-oral, pelo consumo de águas ou alimentos contaminados, através de contacto com animais ou de pessoa-a-pessoa (Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019)

1.1.4.1. Consumo de alimentos contaminados

A. butzleri é comumente encontrado em animais para consumo humano, como carne de aves, de vaca, de porco, entre outros. Para além disso, é também detetado em ambientes de processamento de alimentos, como por exemplo de produtos láteos, ou mesmo em alimentos não processados, como vegetais e frutos do mar (Hsu and Lee 2015). Numa revisão literária, Hsu and Lee (2015), com a finalidade de avaliar a prevalência de *A. butzleri* em aves, nomeadamente frango e peru, em bovinos, e em ovinos, observaram que a predominância desta bactéria nestes animais seria de 35,9%, 54,3% e 13,7%, respetivamente (Hsu and Lee 2015). *A. butzleri* tem sido associado a enterites e diarreias em suínos, bovinos e cavalos, sendo que por norma os suínos e bovinos estão

destinados ao consumo humano (Collado, et al. 2011). Para consumo, estes animais que passam por um processo de abate e desmanche, quando infetados, as suas fezes podem contaminar as carcaças, e por sua vez o contacto destas com as superfícies leva à possibilidade de que haja contaminações cruzadas em matadouros. Por esta razão, são os produtos de origem animal considerados uma das principais fontes de contaminação por *Aliarcobacter* spp. (Collado and Figueras 2011; Ferreira et al. 2017a). Também, os seus derivados ou produtos alimentares associados, como o leite cru ou o queijo curado são potenciais portadores desse mesmo género (Giacometti et al. 2013; Pianta et al. 2007; Scullion, Harrington, and Madden 2006).

Existem diversos estudos que referenciam a prevalência de *Aliarcobacter* spp. em alimentos, como é o caso de um estudo na Irlanda do Norte que recolheu amostras de produtos à venda, nomeadamente de leite, carne de aves, carne de suínos e carne de bovinos, sendo que nenhum destes alimentos foi submetido a um processo de cozedura. Assim, detetaram que *A. butzleri* foi a única espécie predominante em todas as carnes cruas prontas para comercializar, e única isolada em amostras de leite cru. Já *A. cryaerophilus* foi detetado com menor frequência, e por fim *A. skirrowii* que apenas foi detetado como co-contaminante (Scullion et al. 2006). Ainda considerando os produtos lácteos, foi realizado um estudo no ano de 2013, em duas queijarias, uma artesanal e uma industrial, onde foram recolhidas amostras de queijos e leite, e amostras das superfícies de cada uma das fábricas, de modo a conseguir detetar isolados de *Aliarcobacter* spp. Neste estudo todos os isolados foram identificados como *A. butzleri*, sendo que foram recolhidos estes patogénicos, tanto nas amostras ambientais, como no leite cru e queijo da queijaria artesanal. Por outro lado, na queijaria industrial apenas foram recolhidos isolados das superfícies, remetendo assim para a possibilidade de que o processamento de alimentos nas duas fábricas possa ser avaliado como uma potencial fonte de contaminação para os queijos (Giacometti et al. 2013).

O consumo de vegetais é outra possível via de transmissão de arcobactérias, contudo não há estudos que liguem o consumo de vegetais ao desenvolvimento de doença (González, Morejón, and Ferrús 2017). Geralmente alimentos que passam pelo processo de cozedura são considerados seguros, no entanto devido às grandes quantidades de vegetais consumidos pela população e ao facto de os vegetais frescos puderem não ser sujeitos a qualquer tipo de confeção, esses alimentos podem ser apontados como um risco para a saúde pública (González and Ferrús 2011). Diversos estudos têm relatado a contaminação de vegetais por *Aliarcobacter* spp, como é o caso de um estudo realizado em amostras de vegetais pré-cortados prontos para consumo, onde foi detetado que 27,5% das amostras continham estes microrganismos, sendo que 90,9% correspondiam a *A. butzleri*, e os restantes 9,1%, a *A. cryaerophilus* (Mottola et al. 2016). Outro estudo realizado em Valência, Espanha, em que foram recolhidas 100 amostras de vegetais frescos, em mercados locais, indicaram a presença de *Aliarcobacter* spp. em 25 dessas amostras, sendo que 17 delas correspondiam a isolados de *A. butzleri* (González, Morejón, and Ferrús 2017).

Considerando a prevalência de *A. butzleri* em ambientes aquáticos (Nurhan et al. 2010) é de crer que este microrganismo esteja também presente nos seres vivos que nele habitam, e que por consequência sejam uma fonte de transmissão para quem os consome. De modo a perceber a prevalência deste patógeno em ambientes marinhos são vários os estudos que relatam a presença de *Aliarcobacter* spp. em peixes e moluscos, como por exemplo um estudo realizado em 2009, que englobou um total de 56 amostras de mexilhão, em que 23 destas estavam contaminadas por esta bactéria, com uma maior prevalência em *A. butzleri* (Collado, Guarro, and Figueras 2009). Também um estudo no Chile, onde foram analisadas 22 amostras de mexilhão foi possível isolar *A. butzleri* em cinco destas (Fernandez et al. 2015). Mais recente, um outro estudo de Rathlavath et al. (2016), reportou a presença desta bactéria em amostras que incluíam peixe, moluscos e águas costeiras, sendo que num total de 201 amostras detetaram que 66 destas, ou seja 32,8%, continham este microrganismo.

Assim, diversos são os estudos que apontam a distribuição desta bactéria ao longo da cadeia alimentar, apontando o consumo de alimentos contaminados como uma potencial via de transmissão de *A. butzleri* (Collado and Figueras, 2011).

1.1.4.2. Consumo de águas contaminadas

Relativamente à água, esta é considerada das mais importantes fontes de contaminação por *A. butzleri* (Collado et al. 2008; Collado and Figueras 2011; Talay, Molva, and Atabay 2016), destacando que esta bactéria já foi isolada e identificada em diferentes ambientes aquáticos, como por exemplo, em água do mar, rios, águas subterrâneas, águas residuais e reservatórios de água potável, e em distintos pontos do planeta (Collado et al. 2008). O facto das espécies do género *Aliarcobacter* estarem presentes em águas bem como a sua capacidade de sobrevivência nesses ambientes proporciona a que seja um patógeno com potencial de veiculação hídrica, bem como a que a água seja uma das fontes de contaminação deste microrganismo (Collado, et al. 2011; Ferreira, Oleastro, and Domingues 2017b; Ferreira, Oleastro, and Domingues 2019).

As primeiras evidências desta fonte de contaminação remetem para os anos noventa, sendo que uma delas foi o isolamento de *Aliarcobacter* spp. em amostras recolhidas num canal de água na Tailândia (Dhamabutra, Kamol-Rathanakul, and Pienthaweechai 1992). No ano seguinte, em 1993 foi possível o isolamento deste mesmo microrganismo em amostras recolhidas num reservatório de água potável na Alemanha (Jacob, Lior, and Feuerpfeil 1993), sendo que em todas elas foi possível isolar *A. butzleri*. Em 1997, num estudo de Musmanno et al. (1997), num rio, em Itália foi também detetável a presença deste patógeno.

Um outro estudo, realizado em 2004, com o objetivo de analisar a presença de *Aliarcobacter* spp, mais precisamente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, na costa do mar Mediterrâneo, em Messina, Itália, foi isolado *A. butzleri* tanto na sua forma livre, como associado ao plâncton (Fera

et al. 2004). Já na Catalunha, um estudo realizado com 205 amostras, das quais 159 eram de água doce e as restantes eram de água do mar e de águas residuais, foi detetada a presença de *Aliarcobacter* spp. em 55,1% das amostras (113/205), sendo que a espécie predominante era *A. butzleri*, com uma percentagem de 94% (Collado et al. 2008).

Deste modo, *Aliarcobacter* spp. é considerado um organismo patogénico emergente que pode ser transmitido pela água, sendo que a prevalência global deste microrganismo nos diferentes ambientes aquáticos é de 91% em águas residuais, 87,1% em lagos e rios, 75,2% em águas de praias, 43,8% em águas subterrâneas, 17,6% em água do mar, e de 3,2% em águas potáveis (Hsu and Lee 2015).

De forma a relacionar a água como via de transmissão desta bactéria, surgiram alguns relatos de alguns surtos, por exemplo o que decorreu em 2004, associado a águas subterrâneas, e que afetou aproximadamente, 1450 moradores e turistas na região do lago Erie, nos EUA. Neste caso, a qualidade microbiológica de água de dezasseis poços que fornecem água potável para a população foi avaliada, sendo que sete desses poços deram positivo para *Aliarcobacter* spp. Em suma deste surto, pensa-se que estas contaminações foram resultantes do transporte de contaminantes microbiológicos das instalações de tratamento de águas residuais e fossas sépticas para o lago e sub-superfície, após uma extrema precipitação que decorreu entre os meses de maio e julho de 2004 (Fong et al. 2007). Apesar de não conseguir estabelecer uma relação direta entre a presença desta bactéria nas amostras de águas com a doença verificada nos moradores da região, este estudo aponta a água como uma potencial via de transmissão desta bactéria.

1.1.4.3. Transmissão por contacto com animais domésticos

A transmissão por contacto com animais domésticos tem sido também apontada como uma das possíveis causas para a disseminação de arcobactérias num ambiente doméstico (Fera et al. 2009). Com o objetivo de avaliar a presença destes microrganismos em amostras biológicas da cavidade oral em gatos domésticos, e de verificar se estes poderiam ser uma possível fonte de infeção humana, no sul de Itália recolheram-se amostras de 85 gatos, sendo que desses, 67 deram positivo para esse microrganismo, mais precisamente 66 foram detetados com *A. butzleri* e 29 com *A. cryaerophilus* (Fera et al. 2009).

Um outro estudo realizado entre julho de 2006 e setembro de 2007, que englobava um total de 267 cães e 61 gatos, possibilitou a recolha de amostras biológicas da cavidade oral e de fezes dos mesmos. Os resultados deste mesmo estudo deram negativo quanto à presença de arcobactérias em gatos, no entanto foi possível isolar duas espécies deste microrganismo tanto na cavidade oral como em fezes de cães, sendo que as espécies isoladas foram *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* (Houf, Smet, and Bare 2008). Em suma, neste estudo os autores ainda reforçam a ideia de que o facto de não ter sido possível o isolamento de arcobactérias em gatos, não significa que estes animais não

sejam potenciais vetores deste microrganismo (Houf et al. 2008), tal como apresenta o estudo anterior.

Também noutros estudos efetuados no Japão, Bélgica, Austrália e Itália, as espécies predominantes em animais domésticos (cães e gatos), foram *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*. *A. skirrowii* foi também detetado nestes animais, contudo a frequência da sua presença é baixa, quando comparada com as outras espécies referenciadas anteriormente (Fera et al. 2009; Houf et al. 2008; Goni et al. 2017)

Assim, para além do consumo de alimentos e água serem considerados uma via de transmissão, o contato com animais domésticos, nomeadamente cães e gatos é também uma possível via de disseminação de arcobactérias para humanos (Fera et al. 2009; Houf et al. 2008).

1.1.4.4. Transmissão entre humanos

A transferência entre humanos foi também já sugerida como uma possível via de transmissão de arcobactérias. Esta foi pela primeira vez relatada em 1983, numa escola em Itália, em que um surto de cólicas abdominais afetou 10 crianças, sendo que nenhuma delas teve diarreia, contudo 3 delas tiveram de ser hospitalizadas (Vandamme, et al. 1992a). O organismo foi isolado das fezes e identificado como sendo *A. butzleri*, apontando os dados para uma relação epidemiológica, o que sugeriu a possibilidade de ter ocorrido uma transmissão pessoa-a-pessoa (Vandamme, Pugina, et al. 1992).

Um outro episódio, que demonstra a possibilidade de transmissão pessoa-a-pessoa, foi relatado por On et al., em 1995. Estes investigadores descreveram um caso de um neonato portador de *A. butzleri*, sugerindo que a infeção foi contraída no útero da mãe, mesmo que esta nunca tenha apresentado quaisquer evidências de doença. O tratamento da infeção do recém-nascido foi bem-sucedido, no entanto houve uma dificuldade inicial devido à ampla resistência deste microrganismo a antibióticos (On, Stacey, and Smyth 1995).

1.1.5. Resistência de *Aliarcobacter butzleri* a antibióticos

Em 1928 foi descoberto o primeiro antibiótico, a penicilina, e desde então estes têm-se tornado indispensáveis para o tratamento de doenças na saúde pública, pois permitem prolongar e melhorar a qualidade de vida humana (Radlinski and Conlon 2018). Contudo, o uso excessivo de antibióticos e a sua utilização inadequada em medicina humana e veterinária, pode ter induzido que algumas estirpes bacterianas se tornassem resistentes a alguns antimicrobianos (McDermott et al. 2002). Assim atualmente, está-se a viver um problema bastante preocupante no que diz

respeito às resistências a antibióticos, pois muitas das bactérias já têm mecanismos de multirresistência, ameaçando a eficácia dos antimicrobianos sobre estes organismos patogênicos, colocando a saúde humana em risco (Alam et al. 2019).

Posto isto, e redirecionando a problemática da multirresistência para o foco do presente estudo, nomeadamente *Aliarcobacter*, é de realçar que já foram relatados casos de resistência a antimicrobianos tanto em estirpes isoladas de humanos como de animais. Até ao momento não existem muitos estudos acerca destas bactérias, sendo que estes estão limitados a três espécies distintas, nomeadamente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. Esta falta de informação dificulta a avaliação da frequência de resistência deste patogénico em todo o mundo, sendo urgente compreender mais sobre os mecanismos de resistência do mesmo (Ferreira et al. 2016).

Um estudo de Ferreira et al., (2019) com o objetivo de avaliar os resultados da taxa de resistências antimicrobianas em isolados de *Aliarcobacter* spp. apresentou uma revisão sistemática com meta-análise. A análise feita foi baseada nos antibióticos que normalmente são recomendados no tratamento de infeções por *Aliarcobacter* spp., tendo sido selecionadas as seguintes classes de antibióticos: macrólidos, quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, e β -lactâmicos (Ferreira et al. 2019). Das classes antimicrobianas estudadas, *Aliarcobacter* spp. apresentou maior taxa de resistência à penicilina, pertencente aos β -lactâmicos, variando entre 69,3 a 99,2%, enquanto que no caso das cefalosporinas esta variou entre 30,5 a 97,4% (Ferreira, et al. 2019). Considerando a classe das quinolonas, esta bactéria apresentou menor taxa de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina (quinolonas de segunda geração) e à levofloxacina (quinolona de terceira geração), quando comparado com o ácido nalidíxico, quinolona de primeira geração. Contudo, os resultados deste estudo apontam para uma tendência crescente de resistência à ciprofloxacina e levofloxacina ao longo do tempo (Ferreira, et al. 2019). Relativamente aos macrólidos, nomeadamente para a eritromicina, a azitromicina e espiramicina foram observadas taxas de resistência de 10,7%, 39,8% e 26,5%, respetivamente (Ferreira, et al. 2019). Estudos revelam também, que a percentagem de resistência a tetraciclina é maior do que para os aminoglicosídeos (Ferreira, et al. 2019).

No que diz respeito a *A. butzleri*, e atendendo à meta-análise que foi realizada por Ferreira et al. (2019), esta foi a espécie que menor sensibilidade mostrou à ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico (AMC), cefalotina, azitromicina e levofloxacina, em contrapartida foi, em geral, bastante suscetível à eritromicina, gentamicina, tetraciclina, estreptomicina, enrofloxacin e doxiciclina (Ferreira, et al. 2019).

Apesar das infeções por *A. butzleri* serem normalmente autolimitadas, o que significa que na maioria dos casos não requerem terapia antimicrobiana, pois é limitada pelas próprias defesas do organismo hospedeiro, há sempre situações mais complexas, onde é necessário a intervenção de um tratamento com antibióticos para que a infeção causada por este microrganismo possa ser resolvida (Collado e Figueras, 2011). Nestes casos o tratamento recomendado para infeções por

esta bactéria é geralmente baseado na utilização de fluoroquinolonas, tetraciclinas e aminoglicosídeos, como a gentamicina e a estreptomicina (Ferreira et al. 2016; Rathlavath, et al. 2017; Vandenberg et al. 2004). Contudo há relatos recentes de que algumas estirpes de *A. butzleri* sejam resistentes à tetraciclina (Vicente-Martins et al. 2018; Yesilmen et al. 2014). Outros antimicrobianos para os quais têm vindo a ser relatadas altas taxas de resistência são a ciprofloxacina, eritromicina e ácido nalidíxico (Dekker et al. 2019; Isidro et al. 2020). Níveis de multirresistência elevados podem levar ao comprometimento do tratamento de infeções causadas por *A. butzleri*, verificando-se taxas de multirresistência que podem variar entre 20 a 93,8 % entre os isolados de animais, produtos alimentares, meio ambiente e amostras humanas (David, Pejchalová, and Lucie 2017; Isidro et al. 2020; Kabeya et al. 2004; Shah et al. 2013; Vicente-Martins et al. 2018).

Diversos são os mecanismos que podem estar associados a resistência a antibióticos, sendo que uma das possíveis associações que podem ser feitas à multirresistência a antimicrobianos, e que têm chamado a atenção dos investigadores, são as bombas de efluxo em bactérias de Gram-negativas, visto que têm a capacidade de expelir várias classes de antimicrobianos estruturalmente distintas para fora das células bacteriana (Colclough et al. 2020).

Assim, é importante perceber quais os tipos de mecanismos de resistência a antibióticos que podem ser apresentados por *A. butzleri*, bem como entender quais as condições propícias para a eficiência no seu tratamento, sendo que para o sucesso deste, o antibiótico deve atingir o alvo em quantidade suficiente, e não deve ser inativado ou modificado pelo mesmo (Senka Dzidic 2008).

1.1.5.1. Mecanismos de resistência bacteriana

É cada vez mais comum encontrar-se bactérias que sejam resistentes a antimicrobianos, isto deve-se provavelmente ao uso inadequado de antibióticos, que proporcionaram a que os microrganismos patogénicos adquiram mecanismos de sobrevivência (Alam et al. 2019; Kumar and Schweizer 2005; McDermott et al. 2002).

Considerando os possíveis mecanismos de resistência a antimicrobianos nas bactérias, serão abordados, os mecanismos de resistência a antibióticos e os mecanismos de ação das diferentes classes de antibióticos.

A maioria dos mecanismos de ação nas diferentes classes de antibióticos tem como alvo os processos de tradução, transcrição, replicação do DNA e na síntese da parede celular. Entre as classes de antibióticos mais frequentemente usadas incluem-se os β -lactâmicos, nomeadamente as cefalosporinas, carbapenemos e penicilinas, que têm como alvo a inibição da síntese da parede celular. Os aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicóis, macrólidos, oxazolidinonas e estreptograminas, que são responsáveis pela inibição da síntese de proteínas. As rifamicinas que

funcionam como inibidores da transcrição, e as quinolonas que têm a função de inibir a síntese de DNA, através da sua ligação à enzima DNA girase. Outra classe de antibióticos comumente usada são as sulfonamidas, responsáveis pela inibição da síntese de ácido fólico (Petchiappan and Chatterji 2017).

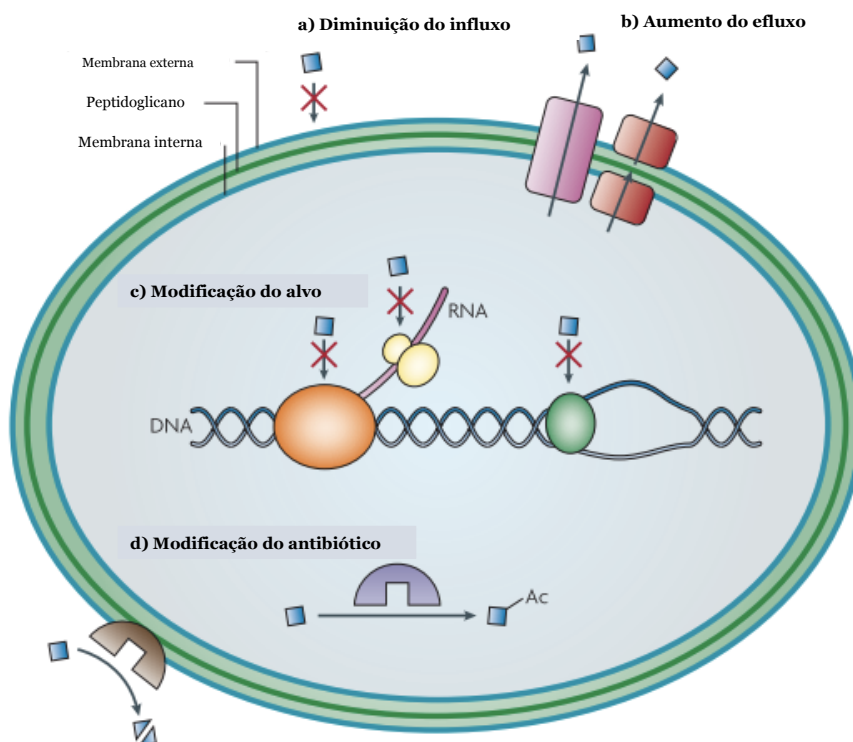


Figura 1 – Representação dos mecanismos de resistência a antibióticos numa bactéria de Gram-negativo. a) Diminuição do influxo, isto é a diminuição da entrada do antibiótico na célula (representado pelos quadrados azuis); b) Aumento do efluxo, devido às bombas de efluxo que secretam antibióticos da célula, sendo que alguns transportadores, como os da família “Resistance Nodulation Cell Division” (representado a rosa), podem bombear antibióticos diretamente para fora da célula, enquanto outros, como os que estão representados a vermelho secretam no periplasma; c) Modificação do alvo, através de mutações que modificam a proteína alvo; d) Modificação do antibiótico, que pode ocorrer por modificação ou degradação do antibiótico. Figura adaptada de Allen *et al.* (2010).

Após o conhecimento da atuação dos mecanismos das diferentes classes de antibióticos, é relevante que se conheçam os mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias para inibir a atuação desses antimicrobianos. Posto isto, são vários os estudos que têm vindo a ser desenvolvidos nos últimos anos que levaram à identificação de genes responsáveis pela resistência intrínseca aos antibióticos em bactérias, sendo que a resistência a estes pode ser adquirida por mutações cromossômicas ou pela transferência horizontal de genes de outras bactérias. Assim, a resistência aos antibióticos em bactérias pode ser desenvolvida por mecanismos distintos, tal como representado pela imagem da figura 1. Assim, pode ocorrer a diminuição do influxo, isto é, a diminuição da entrada do antimicrobiano na célula através de porinas, e caso haja uma diminuição da expressão celular tem como consequência uma diminuição da entrada do antibiótico na célula. Pode ocorrer um aumento do efluxo de antibióticos, devido às bombas de

efluxo que são responsáveis pelo transporte de antibióticos para fora da célula, que através de uma mutação ou sobre expressão de determinada bomba pode levar a um aumento deste efluxo do antimicrobiano para o espaço extracelular. A modificação de antibióticos é outra estratégia de resistência das bactérias, que ocorre quando o antibiótico sofre degradação ou modificação por via enzimática, impedindo a sua ligação ao alvo na célula bacteriana. Por último, a modificação do alvo do antibiótico é outra estratégia para a célula, através de mutações, modificações ou proteção do alvo, de modo a interferir com a ligação do antibiótico ao alvo (Petchiappan and Chatterji 2017).

Um dos mecanismos de resistência a antibióticos que maior impacto tem em bactérias de Gram-negativo é a diminuição de permeabilidade devido à presença da membrana externa que forma uma barreira, oferecendo um mecanismo intrínseco de proteção contra antibióticos hidrofílicos (Peterson and Kaur 2018). Em alguns casos a entrada de antibióticos na bactéria pode ser limitada pela aquisição de mecanismos de regulação da passagem destes, como por exemplo, pela regulação negativa de porinas ou pela substituição destas, por canais mais seletivos (Blair et al. 2015). O efluxo de antimicrobianos para fora da célula é um outro mecanismo usado para resistência da bactéria, sendo que, este mecanismo pode ocorrer em conjunto com outros, como por exemplo a modificação do antibiótico ou do alvo (Peterson and Kaur 2018). Posto isto, um dos papéis das bombas de efluxo é a proteção da bactéria contra agentes tóxicos através do bombeamento de substratos, tais como antibióticos, toxinas e metais pesados para o espaço extracelular, conferindo-lhes em alguns casos tolerância a estes compostos antimicrobianos (Allen et al. 2010).

1.1.6. Sistemas bacterianos de efluxo

Como já foi referido anteriormente, a resistência aos antibióticos é uma séria ameaça para a saúde pública. Um dos primeiros indícios desta resistência foi descrita pela primeira em 1980, por McMurry e seus colaboradores, onde estes reportaram resistência de *Escherichia coli* à tetraciclina, pela extrusão de antibióticos por proteínas codificadas por um plasmídeo (Blanco et al. 2016; McMurry, Petrucci, and Levy 1980). Nesta linha, sabe-se à data que existe uma relação entre o fluxo ativo e barreiras de baixa permeabilidade da membrana externa, revelando assim, a origem da acumulação intracelular de muitos antibióticos (Zgurskaya et al. 2018).

As bombas de efluxo são proteínas de transporte, que podem ser encontradas tanto em bactérias de Gram-negativo, como de Gram-positivo. Estas podem ser compostas por um único ou múltiplos componentes isto é, os sistemas de efluxo em bactérias Gram-positivas apenas compreendem um polipéptido localizado na membrana citoplasmática, enquanto que muitos dos sistemas de efluxo de bactérias de Gram-negativo têm uma organização tripartida, constituídos por um transportador ativo, localizado na membrana interna, uma proteína de fusão de membrana periplasmática, e um canal de membrana externa (Fernández and Hancock 2012;

McMurry et al. 1980; Piddock 2006; Zgurskaya et al. 2018). Para além disso, os sistemas de efluxo podem também ser distinguidos com base no mecanismo de energia utilizado para expelir os compostos tóxicos, sendo que há sistemas de efluxo primários, que utilizam a energia da hidrólise ativa do ATP, e sistemas de efluxo secundário, que extraem energia de gradientes químicos formados por prótons e iões, como por exemplo, o sódio (Sharma, Gupta, and Pathania 2019).

A figura 2 mostra cinco, das seis famílias de bombas de efluxo existentes, e descritas nos procariontes, sendo que as que estão representadas na figura são as bombas de efluxo da superfamília “Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette” (ABC), a superfamília “Major facilitator” (MFS), a família “Resistance-nodulation-cell-division” (RND), a família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE), e a pequena família “Small multidrug resistance” (SMR) (Kumar and Schweizer 2005; Sharma et al. 2019). Mais recentemente foi descrita a existência de uma nova família de bombas de efluxo, sendo esta designada por “Proteobacterial antimicrobial compound efflux” (PACE) (Hassan et al. 2018).

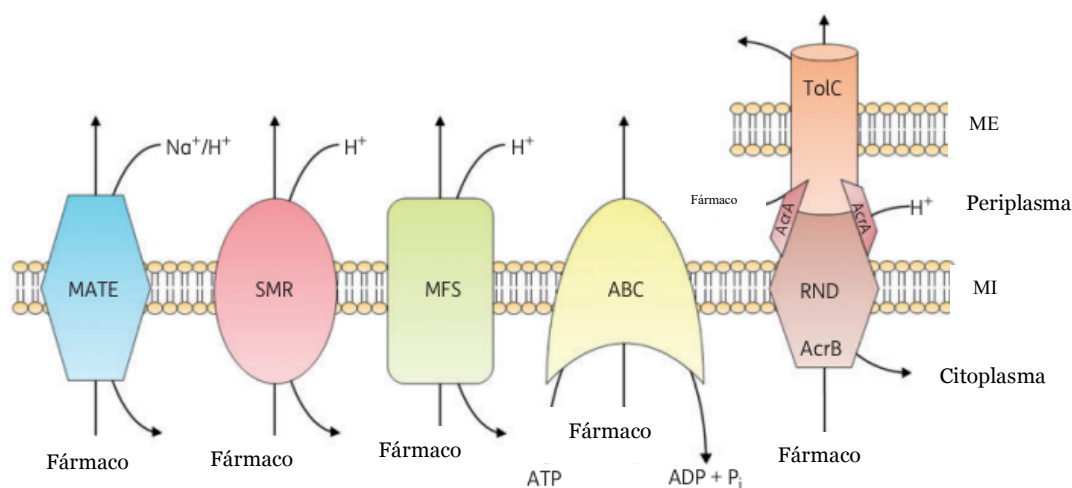


Figura 2 - Ilustração esquemática, que mostra as cinco das seis superfamílias de bombas de efluxo encontradas em bactérias, bem como os seus mecanismos de acoplamento de energia. ME, membrana externa; MI, membrana interna. Imagem adaptada (Alav et al. 2018).

A superfamília MFS é bastante grande e diversificada, incluindo até ao momento mais de mil membros. As proteínas MFS ainda podem ser divididas em três subfamílias, a DHA1, que é responsável por exportar açúcares, aminoácidos, gradientes protónicos e antibióticos, a DHA2, caracterizada por expelir uma ampla gama de fármacos estruturalmente diferentes, e por fim a subfamília DHA3, que apenas está presente em procariontes, e expele antibióticos, como os macrólidos e a tetraciclina (Kumar and Schweizer 2005). Tanto a subfamília DHA1, como a subfamília DHA2 está presente em procariontes e eucariontes (Kumar and Schweizer 2005). Tendo em conta a sua estrutura, onde doze a catorze hélices transmembranares formam uma estrutura compacta, sendo que quatro das hélices se apresentam voltadas a partir do interior, e as restantes formando a cavidade interna. Julga-se que esta cavidade seja responsável pelo

transporte de compostos hidrofóbicos (Sun, Deng, and Yan 2014). É assim proposto um mecanismo, em que o antibiótico tem acesso à cavidade através do citoplasma ou então pela membrana interna, sendo o substrato transportado por um modelo de acesso alternado, denominado de “rocker-switch” (Sun et al. 2014).

Relativamente à superfamília das bombas de efluxo ABC, são as únicas que utilizam a energia derivada da hidrólise do ATP para o transporte de substratos, como por exemplo de açúcares, aminoácidos, íons, antibióticos, polissacarídeos e proteínas (Fath and Kolter 1993; Higgins 1992). Estas são consideradas transportadores complexos multiproteicos, localizados na membrana plasmática da bactéria (Kumar and Schweizer 2005). Contudo as bombas de efluxo pertencentes à família ABC são raras em bactérias, sendo a bomba LmrA de *Lactococcus lactis*, o exemplo mais bem estudado (Bolhuis et al. 1996; Kumar and Schweizer 2005). O transportador proteico ABC é constituído por 4 domínios distintos, em que dois deles são incorporados na membrana, constituídos em geral, por cinco a dez hélices α , contendo os locais de ligação do substrato e/ou o caminho ao qual este é transportado. Os outros dois domínios são domínios de ligação a nucleotídeos localizados no citoplasma, e estão associados entre si, e aos domínios transmembranares (Eckford and Sharom 2009).

Até há bem pouco tempo as proteínas pertencentes à família MATE, por apresentarem topologia semelhante às proteínas MFS faziam parte desta mesma superfamília, no entanto não eram homólogas na sua sequência proteica, o que deu origem a esta nova família. As proteínas da família MATE são caracterizadas por utilizarem um gradiente de Na^+ como fonte de energia para o fluxo de corantes catiónicos e fluoroquinolonas (Kumar and Schweizer 2005). Estruturalmente, todos os sistemas de efluxo da família MATE apresentam uma topologia em doze hélices transmembranares semelhantes, com similaridade interna de sequência dupla originando uma estrutura terciária com lobos N-terminal e C-terminal, apresentando também uma cavidade externa que se estende por metade da membrana (Wong et al. 2014).

Os transportadores SMR, em termos de tamanho, são menores relativamente às restantes famílias de bombas de efluxo. Constituídos apenas por cento e dez resíduos de aminoácidos e quatro hélices transmembranares (Kumar and Schweizer 2005; Wong et al. 2014), esta família pode ser encontrada em muitas bactérias. A bomba mais estudada de transportadores SMR é a EmrE de *E. coli* ou a Smr de *S. aureus*, que são caracterizadas por exportar corantes, antibióticos e catiões (Kumar and Schweizer 2005; Wong et al. 2014). Através dos dados disponíveis relativamente a esta proteína transportadora, pensa-se que o seu mecanismo é baseado num local alternativo simples, onde o substrato se liga e competem com os prótons por esta ligação (Wong et al. 2014).

Por último, e sendo o grupo de estudo abordado neste trabalho, tem-se a superfamília RND, pensa-se que estes transportadores proteicos tenham surgido em bactérias de Gram-negativo, como um mecanismo de sobrevivência das bactérias às toxinas ambientais (Blanco et al. 2016). Além das bactérias, esta superfamília de proteínas, em relatos recentes já foi encontrada em

eucariontes, *Archaea* e até mesmo em humanos (Kumar and Schweizer 2005). Estes transportadores, normalmente são codificados por genes cromossômicos, no entanto em 2004, Hansen e seus colaboradores relataram um transportador RND que foi codificado por um plasmídeo, em *E. coli*. Quanto ao seu mecanismo, este é catalisado pelo efluxo antiporte substrato/H⁺, e desempenham um papel fundamental na resistência intrínseca a uma variedade de antibióticos, o que as leva a assumirem um papel de associação a multirresistência a antimicrobianos (Hansen et al. 2004).

1.1.6.1. Bombas de efluxo da família “*Resistance Nodulation Cell Division*”

Como referido anteriormente, a família de bombas de efluxo RND são o foco de estudo deste trabalho, razão pela qual se justifica uma análise mais aprofundada destas. Em bactérias de Gram-negativo, os sistemas de efluxo da família RND são constituídos por um complexo formado por três proteínas que estão interligadas, consistindo numa proteína de transporte de membrana interna RND com doze hélices transmembranares, uma proteína de fusão periplasmática (que apesar de não ser conhecido o seu papel, é indispensável ao funcionamento do sistema de efluxo), e uma proteína formadora do canal de extrusão na membrana externa. Sabe-se que a proteína de membrana interna desta família de bombas de efluxo é constituída por dois grandes *loops* periplasmáticos entre as hélices transmembranares 1 e 2, e entre a 7 e 8, que contêm resíduos de aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento do substrato (Kumar and Schweizer 2005).

Relativamente às bombas de efluxo nas bactérias de Gram-negativo, todas as seis famílias mencionadas anteriormente têm sido identificadas neste tipo de bactérias, no entanto são as bombas RND, que apresentam uma maior relevância. Além de terem um papel importante na extrusão a múltiplos antibióticos, também exportam biocidas, corantes, detergentes e solventes orgânicos. O facto destas bombas terem uma estrutura tripartida, permite a sua abrangência a toda a parede das células Gram-negativo, permitindo a sinergia com reduzida permeabilidade da membrana externa, que conferirá resistência aos antibióticos (Kumar and Schweizer 2005).

Um exemplo da relevância destes sistemas em bactérias de Gram-negativo é o caso de *E. coli* onde foram detetados, através da análise do seu genoma, sete transportadores do tipo RND, sendo que cinco destas são as bombas AcrAB, AcrEF, AcrD, YhiUV e MdtABC (Nishino and Yamaguchi 2001; Sulavik et al. 2001). Todas estas bombas de efluxo mostraram uma associação ao canal TolC, no entanto apenas a bomba AcrAB demonstrou ter alguma relevância na extrusão de antimicrobianos, isto verificou-se através da construção de mutantes pelo knockout do gene correspondente a determinada proteína de cada sistema de efluxo, para que fosse possível avaliar a influência de cada bomba de efluxo na resistência antibióticos (Sulavik et al. 2001). Posto isto, o sistema AcrAB-TolC demonstra ter um papel na resistência a uma ampla variedade de substratos, como por exemplo para acriflavina, β -lactâmicos, sais biliares, cloranfenicol, violeta

de cristal, brometo de etídio, ácidos gordos, macrólidos, solventes orgânicos e fluoroquinolonas (Kumar and Schweizer 2005).

Pseudomonas aeruginosa é outra bactéria de referência, para a qual se têm apresentado muitos estudos e onde foram já identificados doze operões que codificam para sistemas de efluxo da família RND, no entanto apenas sete foram caracterizados até ao momento, sendo que apenas quatro deles correspondiam a um sistema de efluxo que contribuía para a resistência a múltiplos antimicrobianos, nomeadamente os sistemas MexAB-OprM, MexCD-OprY, MexEF-OprM e MexXY-OprM. A bomba MexAB-OprM, através da inativação do gene *mexAB* demonstrou afinidade às quinolonas, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol, alguns biocidas, bem como outros solventes orgânicos. Demonstrou ainda afinidade aos β -lactâmicos, no entanto a exportação desta classe de antibióticos é um mecanismo que causa algumas dúvidas, pois a resistência mediada por o efluxo a esse grupo de antibióticos é pouco comum (Kumar and Schweizer 2005; Schweizer 1998; Sri Kumar et al. 1998). Relativamente à bomba MexEF-OprN, foi proposto que esta além de ser responsável pela exportação de fluoroquinolonas, tinha ainda um papel de mediador de processos celulares, nomeadamente este sistema está envolvido no efluxo de uma quinolona secretada pela bactéria, a PQS (sinal quinolona das *Pseudomonas*), que atua como um sistema de sinalização celular e promove uma resposta específica no organismo-alvo (Kumar and Schweizer 2005).

Relativamente a *C. jejuni*, considerando que estamos perante uma bactéria que faz parte da mesma família que *A. butzleri*, poderá considerar-se que possa haver semelhanças quanto aos sistemas de efluxo entre estas duas bactérias. Para *C. jejuni* foram estudados dois sistemas de efluxo do tipo RND, nomeadamente a bomba CmeDEF e CmeABC, onde esta última demonstrou ser o sistema que apresentou maior contributo como um dos mecanismos de resistência a antimicrobianos, conferindo resistência a fluoroquinolonas, sais biliares, brometo de etídio e metais pesados (Lin, Michel, and Zhang 2002). A bomba CmeABC consiste numa proteína de fusão periplasmática (*cmeA*), um transportador de efluxo de membrana interna (*cmeB*) e uma proteína de membrana externa (*cmeC*), sendo que estas proteínas são codificadas por um operão de três genes (*cmeABC*), que por sua vez é regulado pelo gene *cmeR*, que codifica uma proteína que tem a função de repressor de transcrição (Lin et al. 2002; Mavri and Možina 2012). Esta família de bombas de efluxo tem então a função de remover toxinas, subprodutos metabólicos, e até mesmo de assumir um papel de diversos mecanismos associados à virulência bacteriana (Blair and Piddock 2009; Helling et al. 2002).

1.1.6.2. Potenciais mecanismos de resistência de *Aliarcobacter butzleri*

Apesar do conhecimento geral existente acerca da resistência bacteriana a antibióticos, pouco se sabe acerca dos mecanismos de resistência de *Aliarcobacter* spp., sendo que alguns mecanismos foram sugeridos considerando a informação existente e a correlação com conhecimento existente relativo a outras bactérias. Assim, em *A. butzleri*, a resistência às fluoroquinolonas foi associada a mutações pontuais específicas na região determinante da resistência às quinolonas do gene *gyrA*, que codifica uma subunidade da DNA girase, nomeadamente na posição 254 deste gene, resultando numa transição de citosina para timina. Esta mutação foi encontrada em diversos isolados de *A. butzleri* com diferentes proveniências, que apresentaram resistência à ciprofloxacina (Abdelbaqi et al. 2007; Ferreira et al. 2016; Isidro et al. 2020). No entanto, a ausência de mutação pontual associada ao gene *gyrA*, sugere que o mecanismo de resistência às quinolonas pode estar relacionado com a captação do antibiótico, através do aumento da impermeabilidade da bactéria, ou pela atividade das bombas de efluxo (Miller et al. 2007). Relativamente à resistência ao cloranfenicol, foi proposto que *A. butzleri* apresentava resistência a este antibiótico devido à presença do gene *cat*, que codifica para o cloranfenicol *O*- acetiltransferase (Miller et al. 2007), no entanto não existe uma associação direta estabelecida entre a resistência ao antibiótico e a presença do gene. A resistência aos β -lactâmicos deve-se provavelmente à presença de três β -lactamases putativas, encontradas no genoma de *A. butzleri* RM4018, sendo que poderá ser reforçada pela presença do operão *IrgAB*, que altera a tolerância à penicilina em *Staphylococcus* (Miller et al. 2007; Peterson and Kaur 2018). Também na análise de 49 diferentes estirpes em *A. butzleri* foram encontrados três genes que codificam para β -lactamases (*bla1-bla3*), sendo que um deles (OXA-15 β -lactamase) pode estar associado à resistência à ampicilina (*bla3*) (Isidro et al. 2020). Considerando o potencial envolvimento dos sistemas de efluxo na resistência a antibióticos em *A. butzleri*, num estudo realizado recentemente por Isidro et al. (2020), com base na análise comparativa do genoma de 49 estirpes de *A. butzleri*, foi detetada a existência de 19 sistemas putativos de efluxo, envolvendo um total de 56 genes. Dez desses sistemas de efluxo encontraram-se presentes em todos os genomas, em contraste nove deles, sendo dois pertencentes à família RND de bombas de efluxo, encontravam-se nos genomas de apenas algumas estirpes. A figura 3 demonstra a grande diversidade de genes relacionados com bombas de efluxo (numeradas de 1 a 19), bem como outros determinantes de resistência a antibióticos identificados nas 49 estirpes de *A. butzleri* (Isidro et al. 2020).

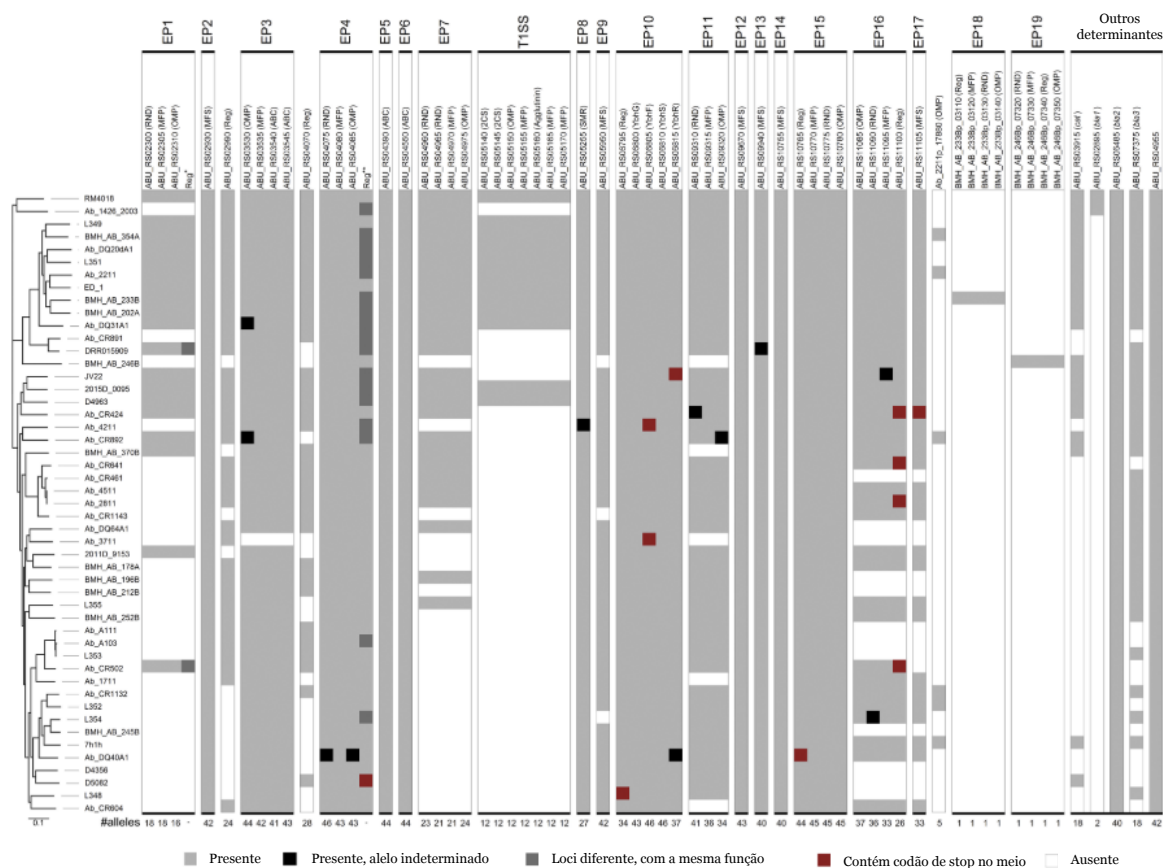


Figura 3 – Representação do repertório de genes relacionados a sistemas de efluxo e outros determinantes de resistência a antibióticos identificados no genoma de 49 estirpes em *A. butzleri* (Isidro et al. 2020).

A presença ou ausência de múltiplos genes relacionados com as bombas de efluxo identificadas entre os 49 genomas estudados, incluíram 19 sistemas de efluxo (EP1-EP19), constituídos por entre um a cinco genes cada, incluindo os genes putativamente associados à regulação das bombas de efluxo, e um sistema de secreção tipo I putativo (T1SS). A função ou homologia prevista foi estabelecida para cada gene, sendo que foi sugerida uma possível associação entre o surgimento de um codão STOP que levaria à codificação de uma proteína truncada do regulador transcricional associado ao sistema EP16 e a resistência à eritromicina (Isidro et al. 2020). A diversidade de sistemas de efluxo putativos encontrados neste estudo e a associação estabelecida entre o sistema EP16 e a resistência a eritromicina, evidenciam o potencial papel das bombas de efluxo na resistência a antibióticos.

2. Capítulo – Objetivos

A emergência de novos agentes patogênicos, e a resistência destes aos antibióticos é um problema multifatorial com repercussões na saúde humana e animal. Apesar de *A. butzleri* ser um microrganismo que apresenta múltiplas resistências a antibióticos, o que pode originar um comprometimento do tratamento de infecções graves causadas por esta bactéria, não existem ainda muitos estudos que aprofundem a natureza dessa resistência em *A. butzleri*. Assim, e no seguimento da análise efetuada recentemente a 49 genomas desta bactéria, em que foram identificados diversos sistemas putativos de efluxo da família RND, o presente trabalho visa avaliar o papel funcional destes sistemas, de modo a elucidar acerca da influência que possam ter na resistência a antibióticos, desinfetantes e outros antimicrobianos.

Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Construção de mutantes por deleção de proteínas de quatro sistemas de bombas de efluxo de *A. butzleri*, nomeadamente codificadas pelo gene *areB*, *areG*, *areLM* e *areN* correspondentes ao transportador de membrana interna dos operões *areABC*, *areGHI*, *areJKLM* e *areNOP* respetivamente;
- Análise da influência da interrupção do gene *areB*, *areE*, *areG*, *areLM* e *areN* no crescimento bacteriano, comparando com a estirpe parental;
- Avaliação do papel funcional dos sistemas de efluxo em estudo, nomeadamente o sistema *AreABC*, *AreDEF*, *AreGHI*, *AreJKLM* e *AreNOP* na resistência a antibióticos, sais biliares e biocidas;
- Avaliação do papel dos diversos sistemas de efluxo na acumulação intracelular de compostos, usando um método de fluorescência, nas estirpes nativa e mutantes.

3. Capítulo - Materiais e Métodos

3.1. Estirpe *Aliarcobacter butzleri* AB28/11

Para avaliar o papel das bombas de efluxo na resistência antimicrobiana foi selecionada a estirpe *A. butzleri* AB28/11. A escolha desta estirpe deveu-se a três fatores, sendo um deles o seu perfil de resistência, isto é para avaliar o papel das bombas de efluxo na suscetibilidade a antimicrobianos é necessária que a escolha da estirpe apresente um alto perfil de resistência a antibióticos. Outro fator está relacionado com o reconhecimento até ao momento de oito sistemas putativos de efluxo da família RND em *A. butzleri*, sendo que cinco deles estão presentes na estirpe *A. butzleri* AB28/11, nomeadamente a bomba de efluxo EP4, EP7, EP11, EP15, EP16, correspondente à bomba AreGHI, AreJKLM, AreNOP, AreDEF e AreABC, respetivamente (Isidro et al. 2020). Por último, um fator importante para a inativação de cada uma das bombas, pela construção de um fragmento que será incorporado no genoma desta mesma estirpe, é o facto de *A. butzleri* AB28/11 ser uma estirpe naturalmente transformável (Bonifácio 2018).

3.1.1. Armazenamento e preparação das estirpes

Para armazenamento da estirpe nativa (*A. butzleri* AB28/11), bem como das estirpes mutadas, nomeadamente *A. butzleri* AB28/11 Δ areB, *A. butzleri* AB28/11 Δ areG e *A. butzleri* AB28/11 Δ areE estas foram mantidas a -80 °C em tubos criogénicos contendo Brain Heart Infusion (BHI, Liofilchem) com 20 % (V/V) de glicerol.

Para posterior utilização de cada estirpe de *A. butzleri* foi necessário cultivá-las em meio Blood Agar base (Oxoid, England) suplementado com 5 % (V/V) de sangue desfibrinado de cavalo (Oxoid, Inglaterra) (BA), e incubá-las durante 24h a 30 °C, em microaerofilia. Para a realização de ensaios, as estirpes de *A. butzleri* usadas no estudo foram repicadas em meio Trypticase Soy Agar (TSA) (constituído por 30 g/L de Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck, Alemanha) e 15 g/L de agar) a 30 °C, em aerobiose, por 24 h. Para conservação das estirpes por períodos curtos, as caixas de Petri, que continham as estirpes foram mantidas a 4 °C, seladas com parafilme.

Relativamente à preparação da estirpe de *E. coli*, que é portadora do plasmídeo pUC18-K2, esta foi inoculada numa placa de Luria Bertani (LB) com 30 µg/mL de canamicina, com posterior incubação durante 24 h a 37 °C, em aerobiose.

3.1.2. Construção dos mutantes de efluxo de *Aliarcobacter butzleri*

Inicialmente procedeu-se à construção de diversos mutantes da estirpe *A. butzleri* AB28/11, onde em cada uma delas foi interrompido o gene codificante para a proteína de membrana interna de cada um dos cinco diferentes sistemas de efluxo da família RND em estudo (Figura 4), usando-se para tal mutagenese insercional e transformação natural da estirpe.

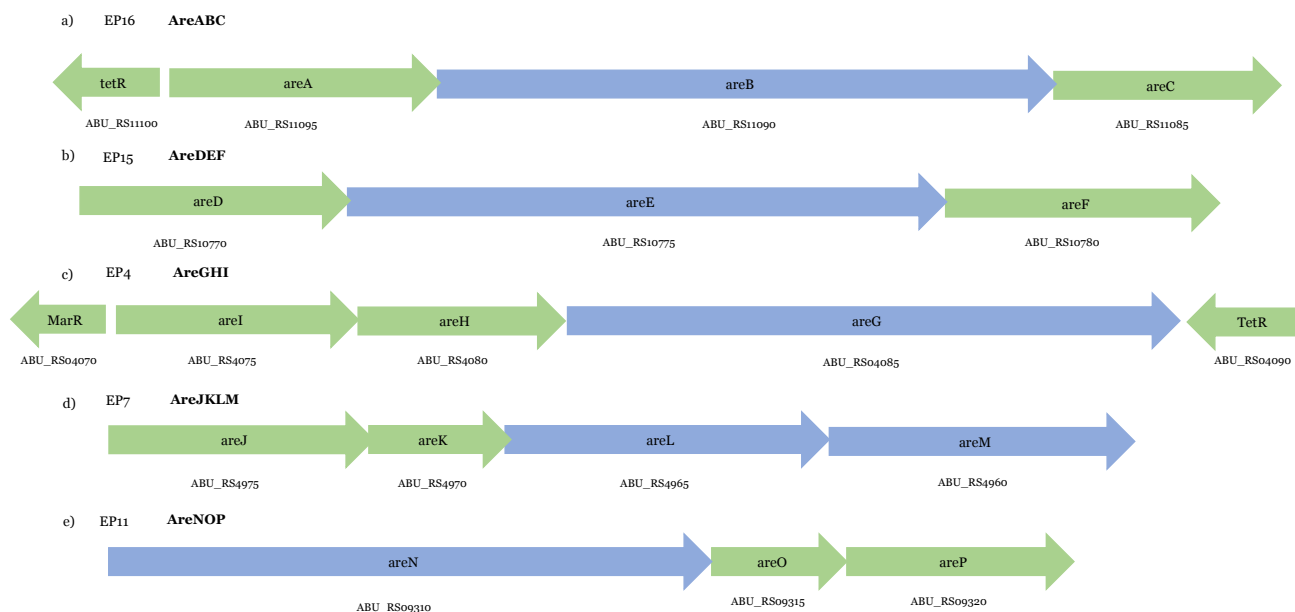


Figura 4 - Representação esquemática dos operões dos sistemas de efluxo em estudo, denominados de (a) AreABC, (b) AreDEF, (c) AreGHI, (d) AreJKLM e (e) AreNOP. A azul estão marcados os genes putativos que codificam para a proteína de membrana interna da bomba de efluxo.

3.1.2.1. Extração de DNA genómico de *Aliarcobacter butzleri*

Para iniciar a extração do DNA genómico foi necessário inocular a estirpe *A. butzleri* AB28/11 em placas de BA, e incubar a 30 °C durante 24 h. Passado este período de tempo, suspendeu-se a biomassa celular em NaCl a 0,85 % (m/V), e procedeu-se de acordo com o protocolo do manual de utilização do kit GF⁻¹ Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis).

3.1.2.2. Obtenção dos fragmentos de DNA transformantes

De forma geral, para a eliminação da expressão do gene alvo, este foi substituído por DNA exógeno correspondente aos fragmentos de DNA transformante. Assim, para a construção dos diversos mutantes, foram inicialmente construídos vários fragmentos de DNA transformante, sendo assim necessário executar diferentes construções dos fragmentos hibridizantes com a cassette, bem como testar diferentes condições para as ligações destes.

3.1.2.3. Extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*

A extração do plasmídeo foi iniciada com a cultura da estirpe de *E. coli*, que é portadora do plasmídeo pUC18-K2, assim esta foi inoculada numa placa de LB com 30 µg/mL de canamicina, e posterior incubação da mesma durante 24 h a 37 °C. Após este período, preparou-se uma pré-cultura inoculando 62,5 mL de meio Terrific Broth (TB), que é composto por 12g/L de triptona, 24g/L de extrato de levedura, 5 g/L de glicerol, 0,17 M de KH₂PO₄, 0,72M de K₂HPO₄, suplementado com 30 µg/mL de canamicina. Esta pré-cultura foi incubada num agitador orbital (Agitorb 200, Aralab), a 37 °C e 250 rpm até se obter uma densidade ótica a 600 nm (DO_{600 nm}) de cerca de 2,6. Esta pré-cultura foi usada para iniciar uma cultura com uma DO_{600 nm} inicial de 0,2, em 62,5 de meio TB suplementado com 30 µg/mL de canamicina durante 16h nas mesmas condições. As células foram recuperadas de imediato por centrifugação (Hettich, Mikro 200R) a 5500 ×g, durante 20 min a 4 °C, sendo que o sobrenadante foi descartado e o depósito celular utilizado para a extração do plasmídeo com o kit NZYMaxiprep (NZYtech). A extração foi realizada de acordo com as instruções do fornecedor, e o plasmídeo foi posteriormente quantificado e a sua pureza avaliada num nanoespectrofotómetro (Implen).

3.1.2.4. Digestão do plasmídeo pUC18-K2

A digestão do plasmídeo foi feita usando os locais de restrição de BamHI e KpnI, sendo que a cassete que confere resistência à canamicina (*aphA-3*) se encontra entre essas regiões (Figura 5). Assim, a digestão do plasmídeo com finalidade de extrair a cassete de resistência à canamicina, foi feita para um volume total de 20 µL, usando 10 U de enzima BamHI (Bioron, Alemanha), 10 U de enzima KpnI (Bioron, Alemanha), 8 µL de buffer K (Bioron, Alemanha), 2 µg de plasmídeo e perfazendo-se o volume com água ultrapura. Posteriormente esta reação foi incubada no termociclador (Biorad, Thermal Cycler), durante 1 h a 37 °C.

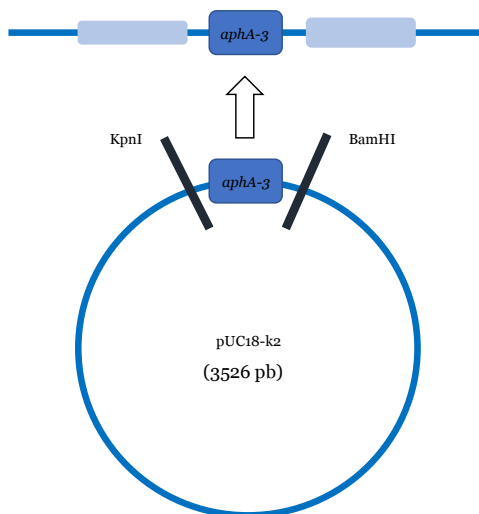


Figura 5 - Representação esquemática da digestão do plasmídeo pUC18-K2, com os locais de corte pelas enzimas KpnI e BamHI obtendo-se a cassete *aphA-3*.

3.1.2.5. Purificação da cassete aphA-3

Após a digestão do plasmídeo, referido no ponto anterior, prosseguiu-se com a purificação da cassete *aphA-3*. Para tal, procedeu-se a uma eletroforese em gel de agarose a 0,6% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, corado com Midori Green (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, carregaram-se as amostras nos poços do gel preparado, bem como o marcador de peso molecular (GRS Universal Ladder, NzyTech). A corrida decorreu durante 40 minutos, a uma voltagem de 120 V, permitindo separar os produtos da reação de digestão de acordo com os seus tamanhos. O gel foi visualizado num transiluminador (Uvitec), sob a luz ultravioleta (UV), o que permitiu o corte da banda de interesse, para posterior purificação da mesma a partir do gel usando o kit PCR and Gel band purification (Grisp, Portugal) de acordo com as instruções do fornecedor.

3.1.2.6. Amplificação dos fragmentos hibridizantes com a cassete aphA-3

Para proceder à construção dos mutantes AB28/11 Δ *areG*, AB28/11 Δ *areB*, AB28/11 Δ *areLM* e i AB28/11 Δ *areN* foi necessário amplificar por uma reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês “*Polymerase chain reaction*”) as extremidades de DNA homólogo tanto a jusante do codão de iniciação como a montante do codão de stop, para isso em cada gene foram usados os seus oligonucleótidos iniciadores correspondentes. No caso do mutante AB28/11 Δ *areLM*, este foi construído considerando a deleção de dois genes que potencialmente codificam para a proteína de membrana interna da bomba de efluxo, nomeadamente o gene *areL* e *areM*. Neste caso, há um codão de stop que reparte aquele que seria o gene codificante para a proteína de membrana interna característica dos sistemas RND em dois, no entanto o conjunto dos dois genes codificariam para uma estrutura idêntica à dos genes dos restantes mutantes. Para permitir a hibridização destes fragmentos à cassete de resistência à canamicina, *aphA-3*, foi então necessário adicionar uma sequência complementar aos oligonucleótidos iniciadores que permitisse a união destes com a cassete. Assim, na tabela 2 são apresentadas as sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados para a amplificação de cada um dos fragmentos hibridizantes, bem como a sua temperatura de hibridização e o tamanho do fragmento amplificado (pares de bases – pb).

Tabela 2 - Sequências e tamanho (pb) dos oligonucleótidos iniciadores, com as suas respectivas temperaturas de hibridização e o tamanho do fragmento amplificado (pb).

Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Temperatura de hibridização (°C)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
areG_A1	5' - AAA CCC AGT TTT TGC TGG TG – 3'	57	308
areG_A2	5' - <i>TTA TTC CTC CTA GTT AGT CAG</i> CAT CAT CAG GAT TTG TTC C – 3'	57	
areG_B1	5' - <i>TAC CTG GAG GAA ATA ATG AAT</i> CAG CTG GAC AGG AAC TGC – 3'	57	347
areG_B2	5' – CTT CAA GTG CCG CAT CAA C – 3'	57	
areB_A1	5' – TTG AAA TAA GGG CTA CTT ACT CAG G – 3'	54	410
areB_A2	5' – <i>TTA TTC CTC CTA GTT AGT CAC</i> TCC AAC ACC ATC TAC TCT TGC – 3'	54	
areB_B1	5' – <i>TAC CTG GAG GGA ATA ATG ATC</i> CAT TAG GAA TTA TTG GTG CAG – 3'	54	417
areB_B2	5' – GTT CGC TCT GGC TTG CAA AT – 3'	54	
areLM_A1	5' – TTG CAA AAG ATT CAG TAG GAA TTG – 3'	54	420
areLM_A2	5' – <i>TTA TTC CTC CTA GTT AGT CAA</i> GCG CTT GAA TTT GTT TTG C – 3'	54	
areLM_B1	5' – <i>TAC CTG GAG GGA ATA ATG ACG</i> ATT TGA TTT AGT TTT TGA TGG -3'	54	381
areLM_B2	5' – GCT GCT TTT GCT ATG GCT TC – 3'	54	
areN_A1	5' – TCA GGA CTT GGA AAA ATC ACT TC – 3'	54	349
areN_A2	5' – <i>TTA TTC CTC CTA GTT AGT CAA</i> ACT CTA TTT GTA AAT CTG CAT CTC C – 3'	54	
areN_B1	5' – <i>TAC CTG GAG GGA ATA ATG AGG</i> TAT TCA AAT AAA TTT TGG AGG AG -3'	54	363
areN_B2	5' – GGG CGA ACT CTT AAT TTT GC – 3'	54	

Nota: Em itálico são os nucleótidos que correspondem a adaptadores para a ligação à cassette *aphA-3*

Para a amplificação de cada fragmento procedeu-se a uma mistura reacional constituída por 4 µL de Phusion HF Buffer (5X) (Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 0,5 µM de cada oligonucleótido iniciador correspondentes a cada par, 2 µL de gDNA da estirpe *A. butzleri* AB28/11, 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) (2U/ µL), perfazendo-se com água ultrapura até se atingir um volume de 20 µL. Esta mistura foi preparada para a amplificação do fragmento A, correspondente à

utilização dos oligonucleótidos iniciadores A1 e A2, e fragmento B, equivalente aos oligonucleótidos iniciadores B1 e B2 para cada gene em estudo.

Após efetuadas as misturas reacionais em tubos de PCR, estas foram incubadas num termociclador (Biorad, Thermal Cycler), e sujeitas a um programa constituído por diferentes ciclos e temperaturas, que foi otimizada para cada reação. O processo foi iniciado por uma desnaturação inicial, a uma temperatura de 98°C, durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos constituídos por três diferentes passos, sendo que o primeiro é a desnaturação a 98°C durante 15 segundos, um passo de hibridização com uma duração de 15 segundos à temperatura de hibridização adequada, finalizando com a extensão a 72°C durante 1 minuto. Após este passo, prosseguiu-se com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Para a análise dos produtos amplificados foi necessário realizar uma eletroforese em gel de agarose de 0,85% (m/V) em tampão TAE 1x, corado com Midori Green, sendo necessário a aplicação de um marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder. A corrida foi feita a 120 V durante 30 minutos, e o gel foi visualizado sob a luz UV num transiluminador. Posteriormente, procedeu-se à purificação do produto de PCR usando o Kit PCR and Gel band purification (Grisp, Portugal), seguindo-se a sua quantificação no nanoespectrofotómetro. A concentração de cada fragmento foi depois ajustada a uma concentração de 30 ng/μL de cada fragmento amplificado, para utilização posterior.

3.1.2.6.1. Ligação dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*

A ligação dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3* é baseada na homologia da extremidade dos produtos de PCR A e B do gene em estudo com esta, tornando esta união possível e a construção do fragmento transformante a usar na transformação (Figura 6).

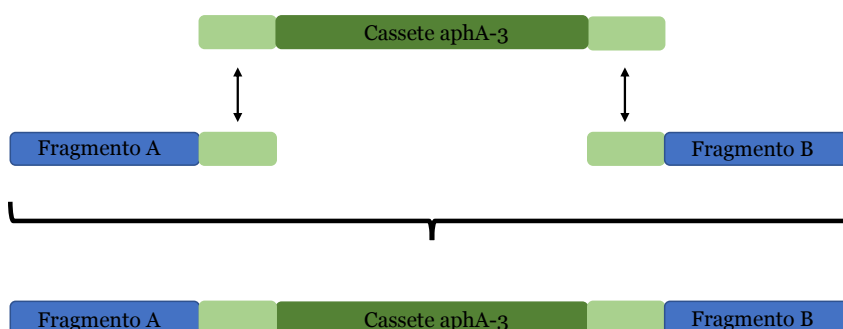


Figura 6 - Representação esquemática da construção do fragmento transformante pela ligação da cassette que confere resistência à canamicina com as regiões a jusante do codão de iniciação (fragmento A) e a montante do codão de stop (fragmento B). Esta representação é aplicada aos genes *areB*, *areG*, *areLM* e *areN*.

A ligação do fragmento a jusante do codão de iniciação (PCR A) com a cassette de resistência à canamicina e com o fragmento a montante do codão stop (PCR B) do gene em estudo foi efetuada por PCR. Assim, procedeu-se a uma mistura reacional constituída por 4 µL de Phusion HF Buffer (5x), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de oligonucleótido iniciador A1 e B2, 30 ng de cada um dos produtos de PCR (fragmento A e fragmento B), 30 ng de cassette *aphA-3*, 0,4 U de Phusion DNA Polymerase, e fez-se o volume até 20 µL com água ultrapura.

Após efetuadas as misturas reacionais, os tubos foram incubados num termociclador, seguindo um programa onde se começou por uma desnaturação inicial a 98°C durante 3 minutos, seguida de 34 ciclos compostos por uma desnaturação a 98°C com uma duração de 10 segundos, uma hibridização durante 20 segundos, a uma temperatura que foi otimizada, e que está representada na tabela 3 para cada mutante, terminando com uma extensão a 72°C ao longo de 1 minuto. O programa termina assim com uma extensão a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 3 - Temperatura de hibridização ótima para a ligação dos fragmentos hibridizantes à cassette de cada mutante e o tamanho do fragmento (pb).

Ligação dos fragmentos hibridizantes à cassette	Temperatura de hibridização (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
areG	54	1505
areB	52	1677
areN	52	1567
areLM	52	1651

A fim de visualizar os produtos da reação foi necessário fazer um gel de agarose a 0,85% em tampão TAE 1x corado com Midori Green, sendo mais uma vez aplicado o marcador de peso molecular GRS Universal Ladder. As amostras foram aplicadas no gel que foi submetido a uma corrida durante 30 minutos a 120 V, com a finalidade de separar os produtos da reação de acordo com o tamanho dos fragmentos. Posteriormente, o gel foi revelado sob a luz UV num transiluminador. Para se obter apenas a banda pretendida procedeu-se a uma purificação de bandas do gel de eletroforese usando o kit PCR e Gel band purification. Após esta purificação, a amostra foi quantificada com o auxílio de um nanoespectrofotómetro.

O mutante *A. butzleri* AB28/11Δ*areE* foi também usado com o objetivo de comparar os diversos sistemas de efluxo do tipo RND existentes na estirpe selecionada, tendo este sido construído previamente (Mateus 2019).

3.1.3. Transformação natural de *Aliarcobacter butzleri*

A transformação natural é a incorporação de DNA exógeno no genoma do hospedeiro (Pimentel and Zhang 2018), sendo que neste caso o processo foi usado para proceder à construção de um mutante com o objetivo de interromper um determinado gene, através da mutagénese insercional. Este método permitiu a inativação dos genes *areG*, *areLM*, *areN* e *areB*, de modo a que posteriormente possa ser avaliar a função das diferentes bombas de efluxo correspondentes.

3.1.3.1. Transformação natural em meio bifásico

A transformação natural em meio bifásico foi realizada na estirpe *A. butzleri* AB28/11 para quatro genes diferentes, seguindo o protocolo anteriormente testado por Bonifácio (2018), para esta estirpe. Primeiramente a estirpe foi repicada numa placa de BA, e incubada a 30 °C durante 24 h em microaerofilia (6% de O₂, +/- 7,1% CO₂ e 3,6% de H₂), atmosfera gerada através de um modificador de atmosfera (Anoxomat AN2CTS, Mart Microbiology B.V.). Após a incubação suspenderam-se as células em meio TSB a uma concentração celular de cerca de 5 x 10⁹ (Unidade Formadora de Colónias) UFC/mL, perfazendo até um volume de 200 µL. Seguidamente, incubaram-se 200 µL de células durante 6 h a 30°C em um tubo de vidro com 1,5 mL de meio BA, nas mesmas condições de microaerofilia anteriormente referidas. Após este período de incubação, adicionou-se 1 µg do fragmento de DNA transformante, contruído anteriormente (ponto 3.2.2.5), às células e voltou-se a incubar sob as mesmas condições de microaerofilia, por mais 5 h. Após este período, transferiu-se 100 µL de células do tubo de transformação, para uma placa de BA suplementado com 50 µg/mL de canamicina. As placas foram por fim incubadas durante 5 dias, numa jarra em microaerofilia, nas condições referidas anteriormente até se obterem colónias típicas de *A. butzleri*. Como controlo negativo, no passo onde se adicionou o fragmento de DNA transformante, este foi substituído por água MiliQ estéril.

3.1.3.2. Transformação natural em meio sólido

No caso de não ser possível a transformação da estirpe por transformação natural em meio bifásico, usou-se um protocolo desenvolvido em meio sólido (Silva 2017). Para iniciar este protocolo repicou-se a estirpe *A. butzleri* AB28/11 em meio BA, e incubou-se em microaerofilia a 30 °C, durante 18 h. Depois, com o auxílio de uma ansa removeu-se a biomassa da placa e ressuspenderam-se as células em 200 µL de meio TSB, e transferiu-se esse volume para uma nova placa de BA, e incubou-se a 30 °C durante 4 h, em microaerofilia. Após este tempo aplicou-se 1 µg de fragmento de DNA transformante, contruído anteriormente (ponto 3.2.2.5), previamente diluído em água MiliQ estéril para um volume total de 40 µL (controlo negativo com a água MiliQ estéril), e transferiu-se esse volume na forma de uma gota para a superfície da cultura. A placa foi novamente incubada em microaerofilia, a 30 °C durante 8 h. Posteriormente, transferiram-se as

células do ensaio e do controlo numa nova placa de BA sem antibiótico, e incubou-se novamente nas mesmas condições por 18 h. Por último, ressuspenderam-se as células em 500 µL de PBS e aplicaram-se 100 µL numa nova placa de BA com antibiótico, nomeadamente canamicina, a uma concentração de 50 µg/mL, e incubou-se em microaerofilia a 30 °C, durante 5 dias.

3.1.4. Verificação da mutagénese

Após a obtenção de colónias nas diferentes transformações naturais, foi necessário a realização de diversos testes para verificar efetivamente, se houve ou não interrupção dos genes, das diferentes bombas de efluxo. Para o sistema de efluxo AreDEF, apesar de o mutante ter sido cedido, procedeu-se igualmente, à confirmação da mutagénese deste, no entanto a sua confirmação apenas foi realizada pela técnica de *Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction* (RT – PCR) (Mateus 2019). Primeiramente confirmou-se a inserção dos fragmentos de DNA transformante, seguido da confirmação da expressão dos diferentes genes.

3.1.4.1. Confirmação da inserção do fragmento de DNA transformante

Para a confirmação da mutagénese nas diferentes transformações naturais, dos diferentes genes de bombas de efluxo, começou-se por repicar as colónias isoladas obtidas nessa mesma transformação para placas seletivas de BA com 50 µg/mL canamicina, de modo a conseguir aumentar a biomassa. Essas placas ficaram a incubar durante 24h, a uma temperatura de 30°C. Após este período de incubação procedeu-se à extração do gDNA de cada um dos clones selecionados, sendo que para isso suspenderam-se as células em 500 µL de água MiliQ estéril. De seguida a suspensão foi submetida à técnica de extração de DNA por fervura, que consiste em submeter as células a um banho seco a 100°C, durante 10 min, seguido de uma centrifugação a 8000 g, a 5 min, à temperatura ambiente. Após isto, recuperou-se o sobrenadante, obtendo-se assim o gDNA de cada um dos mutantes para a verificação dos fragmentos amplificados.

De seguida a amplificação do gene de interesse foi realizada por PCR, sendo que a mistura reacional foi constituída por 1,25 µL de Dream Taq Green Buffer (10x), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de oligonucleótidos iniciadores Forward (areB_A1 ou areG_A1) e Reverse (areB_B2 ou areG_B2), 0,5 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase, 2 µL do fragmento de gDNA a amplificar de cada um dos mutantes, sendo que se completou a reação perfazendo com água até se obter um volume final de 12,5 µL. Como controlo positivo desta reação usou-se o gDNA da estirpe parental em estudo, e como controlo negativo não se adicionou DNA à reação.

Esta mistura reacional foi incubada num termociclador e submetida ao seguinte programa: desnaturação inicial a uma temperatura de 95 °C durante 3 minutos, depois durante 35 ciclos, a reação sofreu uma desnaturação a 95 °C com uma duração de 30 segundos, seguida de uma

hibridização (52 °C para gene *areB*, e o mutante uma temperatura de 62 °C para gene *areG*) durante 30 segundos. Como último passo desta sequência de 35 ciclos, as reações foram submetidas a uma extensão, a uma temperatura de 72 °C durante 90 segundos, sendo que para finalizar o total do programa, sofreram uma extensão final, a 72 °C num período de 10 minutos.

De seguida realizou-se uma eletroforese em gel de agarose, de modo a que fosse possível analisar o tamanho do fragmento amplificado. Para isso preparou-se um gel de agarose a 0,85 % (m/V) em tampão TAE 1x, e corado com Midori Green. Para perceber quais os tamanhos das bandas dos fragmentos, foi adicionado um marcador de pesos moleculares (Bioron, 1 Kb DNA Ladder). A corrida foi assim iniciada a 120 V, durante 30 minutos, de forma a conseguir separar todos os produtos da reação, de acordo com o seu tamanho, e a visualização do gel foi feita um transiluminador.

Após a análise do gel, os mutantes foram armazenados consoante o procedimento descrito no ponto 3.1, deste mesmo capítulo para a realização de posteriores ensaios.

3.1.4.2. Confirmação da expressão do gene

Para confirmar que os genes *areB*, *areE* e *areG* deixaram de ser expressos nos diferentes mutantes, realizou-se uma RT-PCR, técnica que utiliza o RNA total das células em análise para se obter o DNA complementar (cDNA), numa reação com a transcriptase reversa, seguida de um PCR. Neste caso foi necessário extrair ácido ribonucleico da estirpe parental *A. butzleri* AB28/11, e das estirpes mutantes.

3.1.4.2.1. Extração de RNA Total

A estirpe parental, bem como as estirpes mutantes foram repicadas em placas de TSA, e incubadas a 30 °C, durante 24 h, em condições de aerobiose. Após este período, foi preparada uma pré-cultura com uma densidade ótica inicial de 0,05, a DO_{620 nm}, em 10 mL de TSB, e incubada a 30 °C, num agitador orbital a 100 rpm, com uma duração de 16 a 18 h. Posteriormente, desta mesma pré-cultura, iniciou-se uma cultura com uma densidade ótica inicial de 0,02, também ela a DO_{620 nm}, em 20 mL de TSB, sendo que as condições desta cultura foram as mesmas da pré-cultura. Após 6 h de incubação, a meio da fase exponencial, foi recuperado 1 mL de cultura. Esta foi submetida a uma centrifugação, durante 5 minutos a 10 000 ×g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e as células lavadas com 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) a 0,85% (m/V), seguido de uma centrifugação, durante 7 minutos, a 10 000 ×g, a uma temperatura de 4 °C. Após esta centrifugação, recolheu-se o depósito celular e adicionou-se 500 µL de TripleXtractor (Grisp, Portugal). Por fim, as células foram armazenadas a -80 °C, até sua utilização.

Para extração de RNA, começou-se por descongelar as células em TripleXtractor sobre gelo, e adicionou-se 0,1 mL de clorofórmio, seguido de agitação vigorosa, durante 15 segundos. Incubou-se à temperatura ambiente, num período de 3 minutos, e logo de seguida centrifugou-se a 12 000 ×g, durante 15 minutos a 4 °C. Após esta centrifugação, recolheu-se a fase aquosa, à qual se adicionou 1 volume de isopropanol a -20 °C por cada volume de TripleXtractor, e homogeneizou-se por inversão, seguido de incubação durante 10 min, à temperatura ambiente, e logo de seguida centrifugou-se a 12 000 ×g, a 4 °C, durante 10 min. Removeu-se o sobrenadante, e lavou-se o depósito com 1 mL de etanol a 70 %, levando posteriormente a uma nova centrifugação a 12 000 ×g, a 4 °C, por 5 minutos. Posto isto, repetiu-se uma nova lavagem com etanol, e deixou-se secar para que depois se pudesse dissolver o RNA em água DEPC.

Consequentemente, a concentração e pureza da extração do RNA foi avaliada com a ajuda de um nanoespectrofotómetro, e a integridade do mesmo foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose a 0,85 %, numa corrida a 100 V, durante 30 minutos.

3.1.4.2.2. Digestão com DNase I das amostras de RNA Total

Este passo foi realizado para garantir que não haveria possíveis contaminações de DNA nas amostras de RNA, sendo que para isso procedeu-se a uma digestão com DNase I (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). Seguidamente, procedeu-se a uma mistura reacional para cada uma das amostras de RNA, constituída por 1 µL de Tampão da reação (10 x), 1 µL de DNase I, 1 µg de RNA e água ultrapura, de modo a perfazer um volume total de 10 µL. Esta mistura, foi posteriormente incubada a 37 °C, durante 30 minutos, sendo que no fim desse tempo se adicionou 1 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 50 mM, e voltou-se novamente a incubar a reação durante 10 minutos a 65 °C.

3.1.4.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA a partir de RNA da estirpe parental e dos mutantes, utilizou-se o kit Xpert cDNA Synthesis MasterMix (Grisp, Portugal). A mistura reacional foi constituída por 9 µL de RNA tratado com DNase I, segundo o ponto 3.4.2.2., e 10 µL de Master Mix, com uma posterior incubação a 65 °C, durante 5 minutos. De seguida, as amostras foram retiradas para o gelo, onde se adicionou 1 µL de RTases, e posteriormente foram novamente a incubar, sendo submetidas ao seguinte programa: 25 °C durante 10 minutos, 50 °C por um período de 15 minutos, e para finalizar 5 minutos a 85 °C. O cDNA foi então armazenado a -20 °C, até posterior utilização.

3.1.4.2.4. Determinação da expressão genética dos diferentes mutantes

O cDNA obtido anteriormente de cada um dos mutantes, bem como da estirpe parental foi submetido à técnica de PCR. A mistura reacional aplicada foi igual para os diferentes cDNAs, sendo esta constituída por 2 µL de tampão Dream Taq Green Buffer (10 x), 0,2 mM dNTPs, 0,5

μM de cada oligonucleótido iniciador (tabela 4), 1, 25 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase, e 2 μL de cDNA para cada um dos mutantes e para a estirpe parental. Por último adicionou-se água ultrapura até perfazer um volume total de 20 μL. Como controlo negativo usou-se a mistura descrita anteriormente, no entanto não foi adicionado cDNA à mesma.

Tabela 4 -Sequência dos oligonucleótidos iniciadores usados para as reações de RT-PCR, a sua temperatura de hibridização (°C) e o tamanho do fragmento (pb).

Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Temperatura de hibridização (°C)	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
areB_RTPCR_F	5` - TGG AAA TGG ACA AAA TGG TG – 3`	60	190
areB_RTPCR_R	5` - TCC AAG CCC TGG AAT AGA AG - 3`		
areE_RTPCR_F	5` - TCA ATT CGT TCT GAT GAT TCT GA- 3`	56	198
areE_RTPCR_R	5` - TCT ATA AGG AGC TTC ACC TTG GA - 3`		
areG_RTPCR_F	5` - TGG CTA TTA CAG CAA CAA ATG AG – 3`	54	168
areG_RTPCR_R	5` - TGA ATT AAT TGG TAA AAG CTC ACC – 3`		

Após preparação das misturas reacionais, estas foram incubadas num termociclador, e submetidas a um programa de PCR, constituído por etapas distintas: desnaturação inicial durante 3 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos com a desnaturação a 95 °C por de 30 segundos, hibridização por 30 segundos (ajustado de acordo com a tabela 4), e extensão por 60 segundos, a 72°C. Para finalizar o processo, seguiu-se uma extensão final, durante 10 minutos, a 72 °C.

De modo a verificar, a expressão do gene em cada uma das estirpes, correu-se a reação anterior num gel de agarose a 0,85% (m/V), a 120 V durante 45 minutos. Além da reação anterior, num dos poços adicionou-se também um marcador de peso molecular (Bioron, 100 pb DNA Ladder).

3.1.5. Determinação das curvas de crescimento das estirpes mutantes e da estirpe parental

De modo a verificar se a mutação induzida nos diferentes sistemas de efluxo em estudo provoca algum tipo de alteração no crescimento bacteriano, procedeu-se à determinação das curvas de

crescimento das estirpes mutantes, bem como da estirpe parental. Para isso repicou-se cada estirpe em diferentes placas de TSA, e incubou-se durante 24 h a 30 °C. Após este período, procedeu-se a uma pré-cultura em 10 mL de TSB, de modo a começar a mesma com uma DO_{620 nm} inicial de 0,05, à qual foi incubada num agitador orbital, a 100 rpm, a uma temperatura de 30 °C, durante 16 h.

Posteriormente, deu-se início ao ensaio com a preparação da cultura, a iniciar com uma DO_{620 nm} a 0,02, em 20 mL de TSB, nas mesmas condições da pré-cultura. Durante o ensaio, foram recolhidas amostras de 2 em 2h, até chegar à fase estacionária, com a recolha da última amostra às 24 h. Por fim, estes resultados foram analisados através da construção de curvas de crescimento da DO_{620 nm}, em função do tempo. Este ensaio foi realizado em três ensaios independentes. Os resultados foram apresentados como média±desvio padrão, e os dados sujeitos a análise de variância (ANOVA) usando o software Graph-Pad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). P <0.05 reflete diferenças significativas.

3.1.6. Avaliação da suscetibilidade a agentes antimicrobianos

De modo a avaliar a suscetibilidade de *A. butzleri* a diferentes antimicrobianos foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) para diferentes antibióticos, sais biliares e biocidas. Os compostos selecionados, bem como as suas características estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Identificação dos antimicrobianos, sais biliares e biocidas para a determinação da concentração mínima inibitória, bem como as marcas dos mesmos, o seu grau de pureza e o solvente usado para a sua diluição.

	Classe de antibióticos	Agente antimicrobiano	Marca do composto	Grau de pureza (%)	Solvente
Antibióticos	β - lactâmicos	Ampicilina	NzyTech	100	Tampão Fosfato a pH=8
		Amoxicilina	Sigma-Aldrich	100	Tampão Fosfato a pH=6
		Cefalexina	Sigma-Aldrich	100	Tampão Fosfato a pH=6
		Cefotaxima	Acros organics	95	Água
	Aminoglicosídeos	Canamicina	Fisher Chemical	100	Água
		Estreptomicina	Sigma-Aldrich	100	Água
		Gentamicina	Sigma-Aldrich	100	Água
	Fenicolis	Cloranfenicol	Fluka BioChemika	99	Etanol 95%

Tabela 5 – Identificação dos antimicrobianos, sais biliares e biocidas para a determinação da concentração mínima inibitória, bem como as marcas dos mesmos, o seu grau de pureza e o solvente usado para a sua diluição (continuação).

	Classe de antibióticos	Agente antimicrobiano	Marca do composto	Grau de pureza (%)	Solvente
Antibióticos	Quinolonas	Ácido Nalidíxico	Fisher Scientific	100	Adicionar NaOH até dissolver e perfazer o restante volume com H ₂ O
		Ciprofloxacina	Sigma-Aldrich	98	Adicionar NaOH até dissolver e perfazer o restante volume com H ₂ O
		Levofloxacina	Sigma-Aldrich	98	Adicionar NaOH até dissolver e perfazer o restante volume com H ₂ O
		Moxifloxacina	Sigma-Aldrich	100	Adicionar NaOH até dissolver e perfazer o restante volume com H ₂ O
	Tetraciclinas	Tetraciclina	Sigma-Aldrich	98	Etanol 95%
		Doxiciclina	Alfa Alsar	100	Água
	Macrólidos	Eritromicina	Sigma-Aldrich	100	Etanol 95%
		Claritromicina	Sigma-Aldrich	95	Etanol 95%
Sais Biliares		Colato de sódio	Tokyo Chemical	98	TSB
		Desoxicolato de sódio	Tokyo Chemical	98	TSB
Biocidas		Clorexidina	Sigma-Aldrich	20	Água
		Cloreto de Benzalcônio	Sigma	100	Água
		Acriflavina	Sigma-Aldrich	100	Água

3.1.7. Determinação da concentração mínima inibitória

A suscetibilidade a antimicrobianos *in vitro* é normalmente avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória. Basicamente, esta técnica permite determinar qual a concentração mínima que é necessária para que determinado agente antibacteriano impeça o crescimento/desenvolvimento de uma população bacteriana em meio sólido ou líquido (Li et al. 2016).

Desta maneira, e como o objetivo principal deste trabalho é avaliar o potencial papel de bombas de efluxo na resistência ou tolerância a antibióticos, desinfetantes e outros antimicrobianos, procedeu-se então à determinação da CMI dos antibióticos, sais biliares e biocidas acima descritos. A determinação da CMI foi determinada pelo método de microdiluição, em placas de 96 poços. Para isso, as estirpes em estudo foram previamente inoculadas em meio TSA com posterior inoculação a 30 °C durante 24 h. Na preparação das placas de 96 poços, inicialmente procedeu-se à diluição sucessiva de 1:2 de cada antimicrobiano em estudo em meio TSB, a um volume em poço 50 µL, com o intervalo de concentração previamente ajustado de acordo com a suscetibilidade da estirpe em estudo. Numa segunda fase deste protocolo preparou-se o inóculo a aplicar na placa, sendo que para isso procedeu-se à suspensão das bactérias em cloreto de sódio a 0,85 % (m/V), ajustando a turbidez para aproximadamente 0,5 unidades de McFarland. Posteriormente, a suspensão anterior foi diluída de 1:100 em meio TSB, e distribuídos 50 µL desta suspensão celular por cada poço, obtendo-se uma concentração final de cerca de 5×10^5 UFC/mL. Como controlo de crescimento da estirpe em estudo foram colocados em poços 50 µL de meio TSB com 50 µL de suspensão celular, e como controlo negativo foram colocados 100 µL de TSB por poço. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 48 h, sendo que cada ensaio foi realizado pelo menos três vezes em dias independentes. Os resultados foram observados a olho nu consoante a turbidez de cada poço, e confirmados num leitor de microplacas (Biorad, xMark), a uma absorvância de 620 nm, sendo que a CMI de cada composto foi definida como a concentração mais baixa de cada composto, que permitiu a inibição do crescimento da estirpe em estudo.

3.1.8. Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio

Os ensaios de acumulação de brometo de etídio (BrEt) permitem analisar se a interrupção dos genes em estudo altera ou não a acumulação intracelular de compostos. Para isso foi analisada a acumulação do fluorocromo BrEt. Como realização deste ensaio, procedeu-se à preparação da cultura tal como descrito no ponto 3.7., sendo que às 6h de crescimento da cultura, a meio da fase exponencial retirou-se 1 mL de cultura de cada uma das estirpes mutantes e parental. De seguida recolheram-se as células por centrifugação a 10 000 ×g, durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após este passo, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e foram novamente a

centrifugar, durante 7 minutos, a $10\,000 \times g$. Por fim o depósito celular foi ressuspenso em PBS de modo a obter uma $DO_{620\text{ nm}}$ de 0,4.

Posteriormente, e para a realização do ensaio foi utilizada a concentração de $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ de BrEt. Para isso, numa microplaca preta de fundo claro de 96 poços para fluorescência (Greiner Bio-one), foi adicionado o inóculo (anteriormente preparado) de modo a obter-se um volume final de $100\text{ }\mu\text{L}$ em cada poço. De seguida, a placa foi incubada durante 10 minutos a uma temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. O BrEt foi imediatamente colocado antes do início da leitura de fluorescência, ao qual foi lida durante 30 minutos em intervalos de tempo de 1 minutos, usando um fluorímetro (SpectraMax, Alemanha), em condições de excitação a 530 nm e emissão a 600 nm , a uma temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes ensaios foram realizados em duplicado, em três dias independentes. Como controlo de autofluorescência foram utilizados poços com $100\text{ }\mu\text{L}$ de suspensão celular.

4. Capítulo - Resultados e discussão

As bombas de efluxo podem estar associadas a um perfil de multirresistência a diversos antimicrobianos, onde os sistemas do tipo RND são vulgarmente o grupo mais importante de bombas de efluxo em bactérias de Gram-negativo protegendo-as contra diversos compostos nocivos, o que torna relevante o seu papel na resistência de *A. butzleri*.

Atualmente, e após uma análise genómica comparativa de 49 estirpes de *A. butzleri* sabe-se que esta bactéria patogénica apresentou um total de 19 sistemas putativos de efluxo (nominados de EP1 A EP19), pertencentes a várias famílias. Alguns destes sistemas de efluxo pertencem à família RND, podendo encontrar-se em todos os genomas analisados ou só em alguns. Assim, e de modo a avaliar a influência destes sistemas, neste trabalho usou-se uma estirpe naturalmente transformável, e que possui 16 sistemas de efluxo putativos dos quais cinco do tipo RND - *A. butzleri* AB28/11, nomeadamente os sistemas denominados de AreABC, AreDEF, AreGHI, AreJKLM e AreNOP, correspondentes aos sistemas de efluxo, EP16, EP15, EP4, EP7 e EP11, respetivamente. Destes sistemas, as bombas de efluxo AreDEF e AreGHI estão presentes em todas as estirpes analisadas (Isidro et al. 2020).

4.1. Construção de mutantes

Para avaliação da função das diferentes bombas de efluxo, AreABC, AreDEF, AreGHI, AreJKLM e AreNOP na resistência antimicrobiana em *A. butzleri*, procedeu-se à interrupção dos genes: *areB*, *areE*, *areG*, *areLM* e *areN*, respetivamente. Estes codificam todos para uma proteína de membrana interna da bomba efluxo do tipo RND, exceto o gene *areLM* que como referido anteriormente corresponde a dois genes, o gene *areL* e *areM*, que no conjunto codificariam para uma estrutura idêntica à dos restantes genes, uma proteína de membrana interna. Estas proteínas são responsáveis pelo reconhecimento dos diferentes substratos a serem extrudidos da bactéria (Kumar and Schweizer 2005). A obtenção dos mutantes foi iniciada pela construção do fragmento que irá interromper os genes anteriormente mencionados e conferir resistência à canamicina, de modo a posteriormente se conseguir selecionar as colónias mutantes. Após a construção do fragmento, procedeu-se à mutagénesis insercional, tal como é descrito no ponto 3.3..

Primeiramente, para construção do fragmento de DNA transformante foi necessário produzir e extrair o plasmídeo pUC18-k2, visto que este contém uma cassette *aphA-3*, conferente de resistência à canamicina, que foi usada para interrupção dos genes em estudo e seleção dos mutantes. A banda correspondente ao plasmídeo pUC18-k2, o qual tem um peso de 3526 pb, pode ser observada na Figura 7.

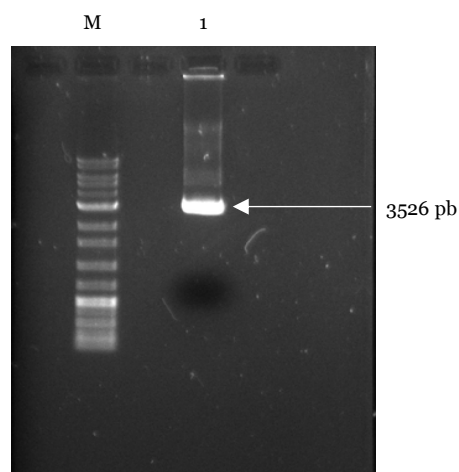


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose que demonstra a extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*. (M: Marcador de pesos molecular GRS Universal Ladder, 1 – pUC18-K2).

Após a extração do plasmídeo, foi necessário proceder-se à digestão do mesmo através das enzimas de restrição, BamHI e KpnI. O produto da digestão, após uma incubação a 37 °C, durante 1 h foi corrido numa eletroforese em gel de agarose, onde foi possível separar os diferentes produtos dessa mesma digestão (Figura 8a), sendo que a banda de interesse correspondente à cassette *aphA-3*, é a que apresenta um peso molecular mais baixo. Após esta separação dos produtos da digestão do plasmídeo foi necessário excisar e purificar a banda de interesse, onde se obteve a cassette *aphA-3* purificada, tal como se pode ver na figura 8b.

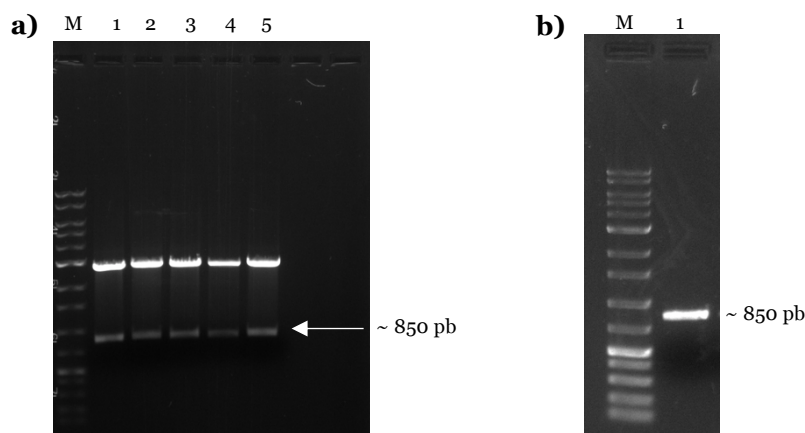


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose de: (a) produtos da digestão do plasmídeo pUC18-K2, com as enzimas BamHI e KpnI. (M: Marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1-5: produtos da digestão do plasmídeo pUC18-K2, onde a seta aponta para a cassette *aphA-3*; (b) cassette *aphA-3* purificada (M: Marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1: cassette *aphA-3*).

Numa etapa seguinte procedeu-se à amplificação através da técnica de PCR de dois fragmentos que possuem regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão de stop dos genes de interesse, que neste caso são o *areB*, *areG*, *areLM* e *areN*. Na figura 9 pode-se constatar a

amplificação de cada um dos fragmentos, referentes aos genes *areB*, *areG*, *areLM* e *areN*, respectivamente.

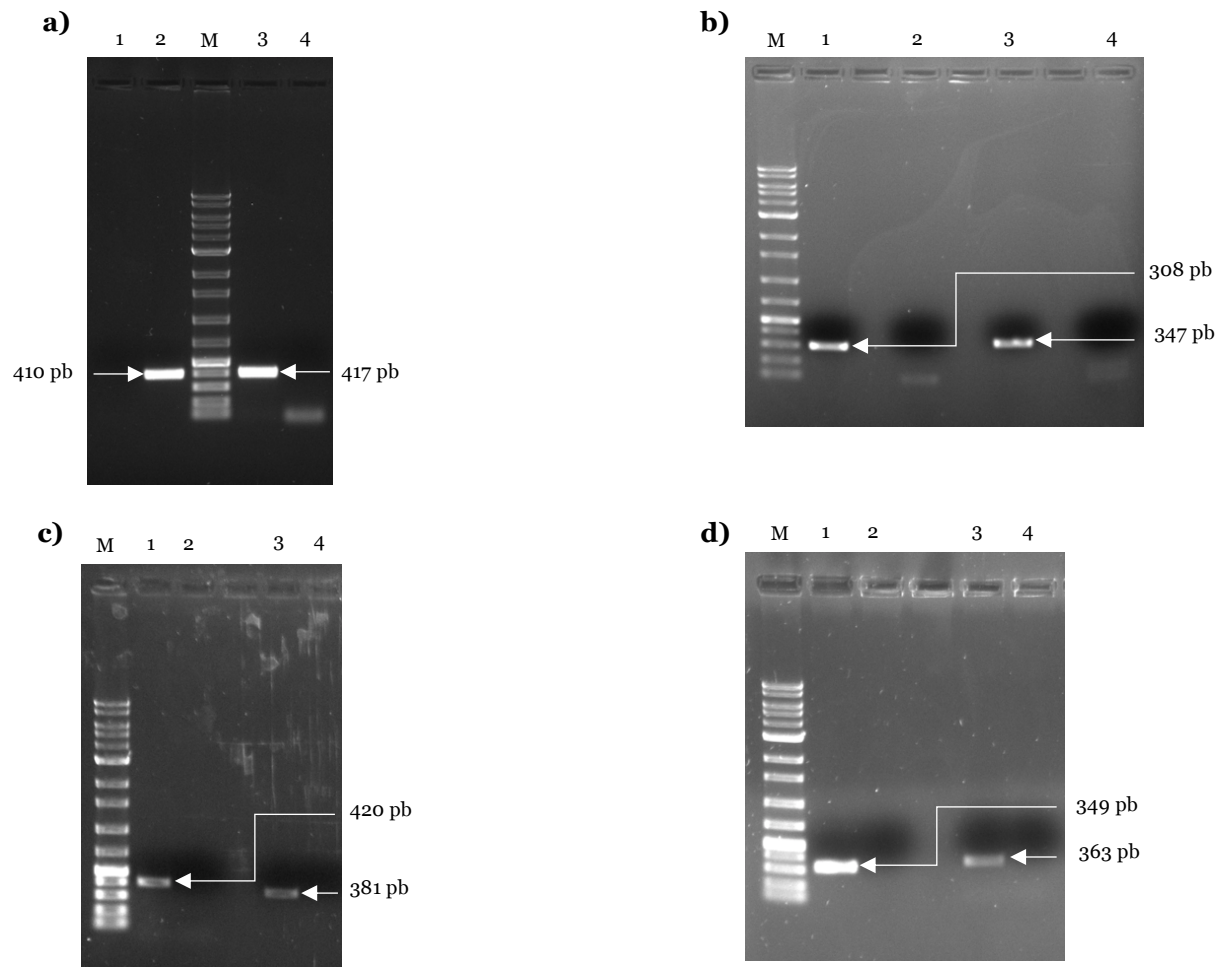


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR correspondentes ao fragmento da região a jusante do codão de iniciação e a montante do codão de stop dos diferentes genes. (a) gene *areB* (1: Controle negativo do fragmento A; 2 e 3: fragmento A e B, respectivamente; 4: Controle negativo do fragmento B; M: Marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder); (b) gene *areG* (1: Controle negativo do fragmento A; 2 e 3: fragmento A e B, respectivamente; 4: Controle negativo do fragmento B); (c) gene *areLM* (1: fragmento A; 2: Controle negativo do fragmento A; 3: fragmento B; 4: Controle negativo do fragmento B). (d) gene *areN* (1: fragmento A; 2: Controle negativo do fragmento A; 3: fragmento B; 4: Controle negativo do fragmento B).

Numa última etapa, e após a obtenção dos fragmentos hibridizantes, bem como da cassete *aphA-3*, que confere resistência à canamicina, procedeu-se à junção dos mesmos através da técnica de PCR, resultando no fragmento de DNA transformante que posteriormente foi usado para o processo de transformação natural, originando assim as diferentes estirpes mutantes. Com a construção dos fragmentos, obteve-se um produto constituído pela cassete *aphA-3* flanqueada pelos fragmentos a montante e jusante do interior do gene de interesse, obtendo-se assim fragmentos de DNA transformante de diferentes tamanhos de acordo com o gene em estudo. As imagens apresentadas na Figura 10 demonstram que a construção dos fragmentos foi bem-sucedida.

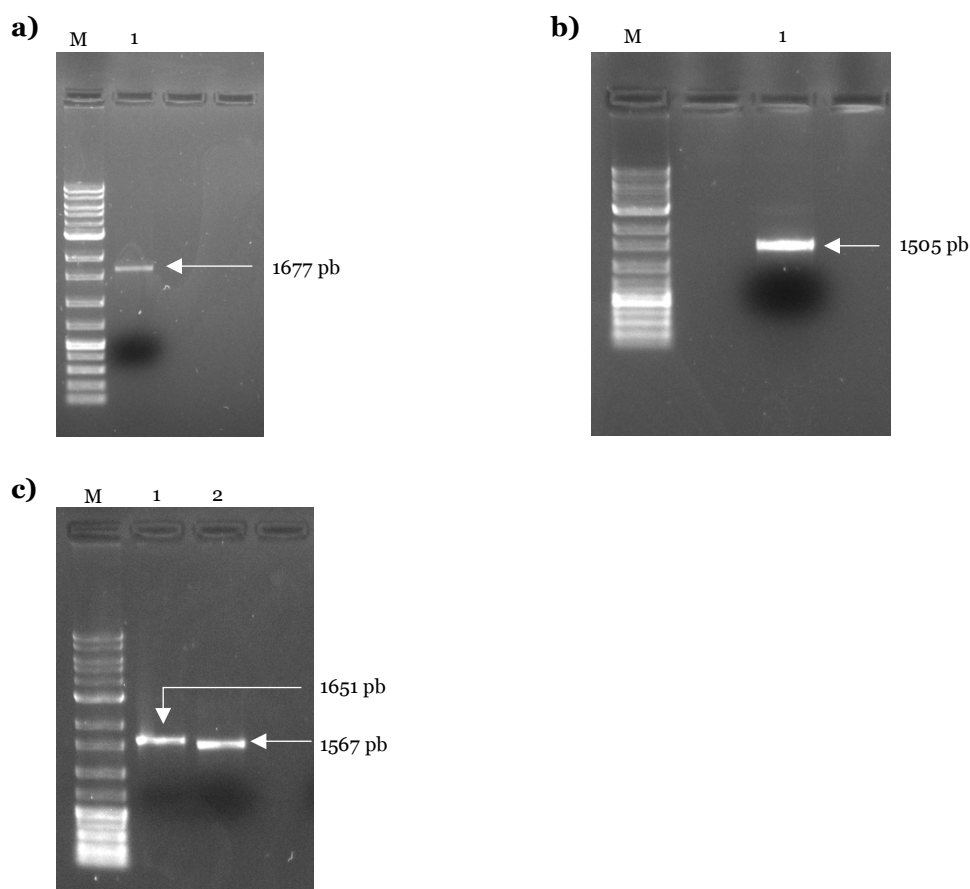


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose representativa do fragmento obtido pela junção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*. (a) 1. fragmento de DNA transformante *areB*; (b) 1. fragmento de DNA transformante *areG*; (c) 1. fragmento de DNA transformante *areLM*, 2. fragmento de DNA transformante *areN*. M: Marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder.

A transformação natural é um processo na qual as bactérias conseguem absorver, incorporar e expressar funcionalmente DNA extracelular, que pode estar presente no meio em que se encontram (Thomas and Nielsen 2005). Quando este processo é possível diz-se que se está perante bactérias naturalmente competentes, competência essa que pode ser expressa quando as bactérias são expostas a condições de stress, como por exemplo num meio com antimicrobianos (Wilson et al. 2003). Esta capacidade de *A. butzleri* foi usada para a construção dos mutantes AB28/11 $\Delta areB$, AB28/11 $\Delta areG$, AB28/11 $\Delta areLM$ e AB28/11 $\Delta areN$.

Para esta etapa, o fragmento de DNA transformante foi colocado em contacto com a estirpe parental, sendo que para a construção do mutante AB28/11 $\Delta areG$ apenas foi aplicada a técnica de transformação natural em meio bifásico, e para os restantes mutantes, AB28/11 $\Delta areB$, AB28/11 $\Delta areLM$ e AB28/11 $\Delta areN$ aplicaram-se ambas as técnicas. Assim, pelo processo de transformação natural da estirpe *A. butzleri* AB28/11 foi construído o mutante AB28/11 $\Delta areG$ tendo sido observado um número de colónias >100 ao fim dos cinco dias de incubação. Já

relativamente à construção do mutante AB28/11 Δ *areB*, esta apenas foi conseguida pela técnica da transformação natural em meio sólido, onde se obtiveram aproximadamente 20 colónias ao fim dos cinco dias de incubação. Relativamente aos mutantes AB28/11 Δ *areLM* e AB28/11 Δ *areN*, ao fim de diversas tentativas de transformação por ambas as técnicas não se observou o aparecimento de qualquer colónia. O processo pode não ter funcionado ou estes genes poderão codificar para sistemas que apresentam um papel essencial à sobrevivência de *A. butzleri* AB28/11.

4.1.1. Verificação da mutagénese

Após a obtenção de clones relativos aos mutantes AB28/11 Δ *areB* e AB28/11 Δ *areG*, foi necessário confirmar se realmente os genes *areB* e *areG* foram interrompidos por recombinação homóloga do fragmento transformante no DNA genómico da estirpe parental. Para isso utilizaram-se duas técnicas, sendo que uma delas foi a amplificação do gene, a partir do DNA genómico das estirpes mutantes, e da estirpe parental. A outra técnica passou pela avaliação da expressão de cada gene através do método de RT-PCR.

Através da técnica de PCR procedeu-se à amplificação do fragmento transformante no DNA genómico das estirpes parental e mutantes, de modo a confirmar a substituição dos genes *areB* e *areG* pelo fragmento de DNA transformante. Nas imagens da figura 11, encontra-se representado o resultado da eletroforese em gel de agarose da corrida dos produtos de PCR resultantes da amplificação de cada gene, onde se verifica que os mutantes AB28/11 Δ *areB* e AB28/11 Δ *areG* incorporaram o fragmento de DNA transformante, que continha a cassette que conferia resistência à canamicina, pois o tamanho do fragmento amplificado das estirpes mutadas é menor quando comparado com o da estirpe parental.

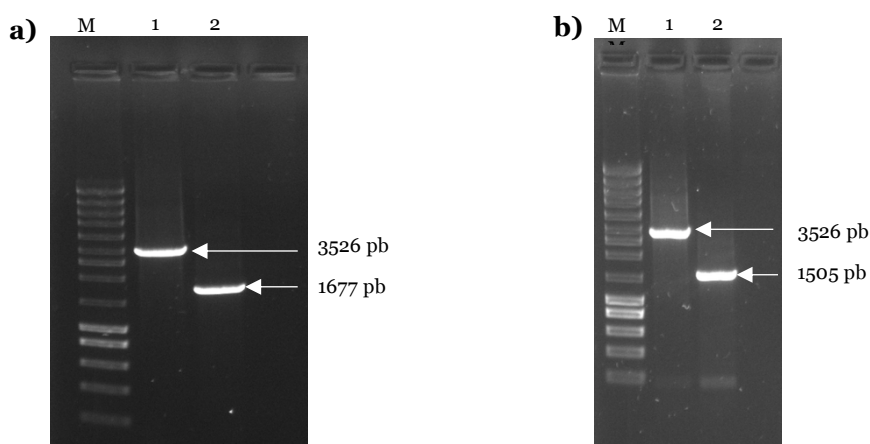


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da reação de PCR do gDNA da estirpe parental de *A. butzleri* e dos mutantes. (a) PCR de confirmação do mutante AB28/11 Δ *areB* (1: Fragmento amplificado a partir da estirpe parental; 2: Fragmento amplificado a partir do mutante AB28/11 Δ *areB*); (b) PCR de confirmação do mutante AB28/11 Δ *areG* (1: Fragmento amplificado a partir da estirpe parental; 2: Fragmento amplificado a partir do mutante AB28/11 Δ *areG*). M: Marcador de peso molecular.

A outra técnica usada para confirmação da expressão dos genes, foi a técnica de RT-PCR, em que através da síntese de cDNA do RNA mensageiro dos mutantes, nomeadamente AB28/11 Δ *areB*, AB28/11 Δ *areE* e AB28/11 Δ *areG*, e da estirpe parental, permitiu verificar a expressão genética por utilização de PCR. Pela imagem da figura 12 consegue-se concluir que os genes *areB*, *areE* e *areG* deixaram de ser expressos, consequência da sua inativação pela sua interrupção com a cassette de resistência adicionada ao fragmento de DNA transformante. Na confirmação por RT-PCR incluiu-se o mutante AB28/11 Δ *areE*, de modo a confirmar a expressão do gene *areE*, e assim prosseguir com todas as estirpes para os ensaios seguintes.

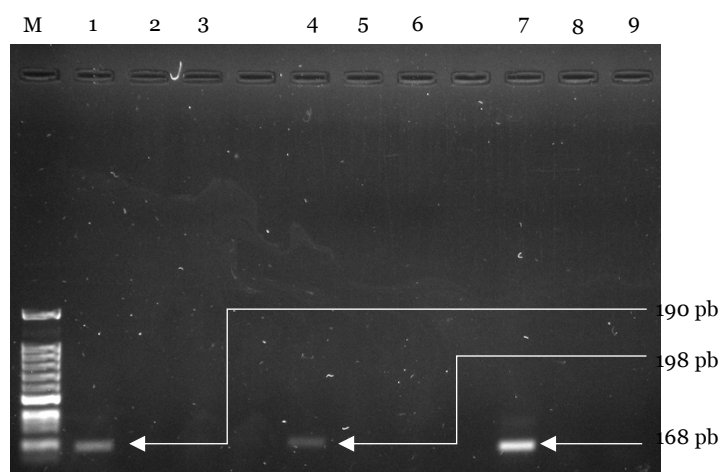


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos do RT-PCR da estirpe parental e dos mutantes. (1: amplificação do cDNA da estirpe parental do gene *areB*; 2: amplificação do cDNA do mutante AB28/11 Δ *areB*; 3: controlo negativo; 4: amplificação do cDNA da estirpe parental do gene *areE*; 5: amplificação do cDNA do mutante AB28/11 Δ *areE*; 6: controlo negativo; 7: amplificação do cDNA da estirpe parental do gene *areG*; 8: amplificação do cDNA do mutante AB28/11 Δ *areG*; 9: controlo negativo; M: Marcador de pesos moleculares.

4.2. Efeito da inativação dos diferentes genes no crescimento bacteriano da estirpe *A. butzleri* AB28/11

Visto que se deletaram distintos genes da estirpe *A. butzleri* AB28/11, originando diferentes mutantes desta, é essencial a realização dos perfis de crescimento dos transformados desta estirpe. A avaliação da curva de crescimento permite perceber se a deleção dos genes influencia ou não o crescimento da mesma, isto porque ao deletar um gene que codifica para uma proteína, pertencente a uma determinada bomba de efluxo do tipo RND, pode-se estar a proporcionar que a extrusão de compostos tóxicos, bem como de alguns compostos benéficos não seja efetuada para fora da célula, podendo isto ter impacto no crescimento celular (Pacheco et al. 2017; Srinivasan et al. 2015).

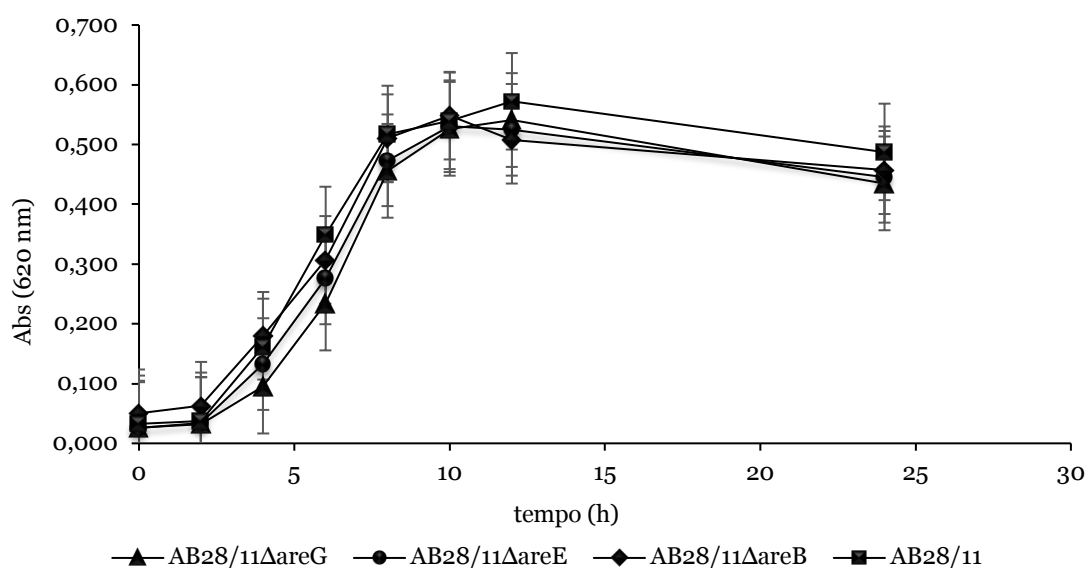


Figura 13 - Perfil de crescimento das estirpes de *A. butzleri* AB28/11 parental e mutadas AB28/11ΔareB, AB28/11ΔareE e AB28/11ΔareG

Avaliando as curvas de crescimento apresentadas na figura 13, pode-se observar que entre as 0 h e as 10 h, as curvas de crescimento da estirpe parental, *A. butzleri* AB28/11, e das estirpes mutantes, AB28/11ΔareB, AB28/11ΔareE, são praticamente sobreponíveis. Também neste intervalo de tempo, observa-se que o meio da fase exponencial para todas as estirpes coincide, sendo aproximadamente às 6 h. Já quando se observa o perfil de crescimento de todas as estirpes, desde as 10 h até às 24 h, verifica-se um ligeiro decaimento no crescimento bacteriano para todos os mutantes, quando comparado ao perfil da estirpe parental, levando a que se conclua que as estirpes mutantes entram em fase de morte ligeiramente mais cedo. No entanto, após análise estatística verificou-se que não há nenhum ponto que tenha uma diferença significativa entre a estirpe parental e a estirpe mutante ($p \text{ value} > 0.05$).

Estes resultados são semelhantes aos observados em outros estudos onde se avaliou o papel de sistemas de efluxo do tipo RND por construção de mutantes desses sistemas. Nomeadamente, num estudo realizado com *Stenotrophomonas maltophilia*, em que foi deletado o gene *smeH*, que codifica para o sistema de efluxo SmeGH, também ele pertencente à família de bombas de efluxo RND, apesar de haver um ligeiro comprometimento no crescimento de uma das estirpes mutadas, os autores não apontam para que o crescimento bacteriano seja afetado pela deleção do gene *smeH* (Blanco, Corona, and Martínez 2019). Também num outro estudo, realizado para avaliar o papel da bomba de efluxo AcrAB-TolC de *Enterobacter cloacae*, em que foram silenciados os genes *acrA* e *tolC* em duas estirpes diferentes, os resultados estão em concordância com os obtidos no presente estudo, isto é, o crescimento bacteriano não é afetado mesmo quando se inativa a bomba de efluxo AcrAB-TolC. No entanto, apesar de não ser uma diferença significativa, quando

foi realizado o knockout ao gene *tolC* este mutante apresentou uma taxa de crescimento inferior à da sua estirpe parental (Pérez et al. 2012).

Relativamente a *A. butzleri*, com a finalidade de avaliar o perfil de crescimento após o silenciamento do gene *areB*, que teve como consequência a inativação da bomba de efluxo AreABC, verificou-se uma ligeira diminuição do crescimento das estirpes mutantes relativamente à estirpe parental, no entanto a estirpe usada não foi a mesma deste trabalho (Silva 2017). Outro estudo, também ele em *A. butzleri* com a estirpe AB28/11, em que foi avaliado o perfil de crescimento após a deleção do gene *areE* foi igualmente demonstrado um ligeiro decréscimo do crescimento do mutante relativamente à estirpe parental, no entanto estes perfis de crescimento bacteriano são similares, comprovando que a deleção do gene não afeta significativamente o crescimento da bactéria (Mateus 2019)

Assim, e atendendo aos resultados dos estudos mencionados anteriormente, estes vão ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo, em que de modo geral o crescimento bacteriano não é afetado após a deleção dos genes *areB*, *areE* e *areG*, significando que os resultados obtidos posteriormente dever-se-ão apenas a um efeito da mutação, e não a uma modificação do perfil de crescimento.

4.3. Avaliação da concentração mínima inibitória para as estirpes parental e mutantes

As bombas de efluxo da família RND presentes em bactérias de Gram-negativo têm a capacidade de remover várias classes de antimicrobianos estruturalmente distintos para o espaço extracelular, contribuindo assim, para a multirresistência a antibióticos. Há também evidências de que outros mecanismos de resistência a antibióticos dependam da resistência intrínseca conferida pelo efluxo de RND, isto é a perda da atividade de efluxo pode alterar a expressão de outros genes envolvidos na resistência intrínseca (Colclough et al. 2020). Este caso verificou-se quando se fez a deleção do gene *acrB* ou *tolC* em *Salmonella*, e se conseguiu correlacionar a perda da atividade de efluxo de bombas RND com a diminuição da expressão da porina de membrana externa OmpF (Webber et al. 2009). Além disso, há outras funções desta família de bombas de efluxo, como é o caso do seu papel estabelecido na virulência de muitos organismos Gram-negativos (Colclough et al. 2020).

Assim, de forma a avaliar o papel das bombas de efluxo do tipo RND determinou-se o contributo de três diferentes sistemas de efluxo (AreABC, AreDEF e AreGHI), permitindo perceber o potencial papel destes na multirresistência de *A. butzleri*. Para isso avaliou-se a suscetibilidade a antibióticos, sais biliares, desinfetantes e germicidas (tabela 6) nas diferentes estirpes de *A. butzleri* parental e mutadas.

Tabela 6 - Concentração mínima inibitória de agentes antimicrobianos, como antibióticos, sais biliares, desinfetante e germicidas para a estirpe parental, e respectivos mutantes.

Classe do Agente antimicrobiano	Agente antimicrobiano	CMI (µg/mL)			
		<i>A. butzleri</i> AB28/11	<i>A. butzleri</i> AB28/11ΔareG	<i>A. butzleri</i> AB28/11ΔareE	<i>A. butzleri</i> AB28/11ΔareB
β- lactâmicos	Ampicilina	128	64	128	128
	Cefalexina	256	0,0625	64	8
	Cefotaxima	64	0,0625	32	2
	Amoxicilina	64	16	64	64
Aminoglicosídeos	Gentamicina	1	1	1	1
	Canamicina	4	>512	>512	>512
	Estreptomicina	8	2	4	0,5
Fenicóis	Cloranfenicol	32	8	32	32
Quinolonas	Ácido Nalidíxico	>256	>256	>256	>256
	Ciprofloxacina	32	16	32	8
	Levofloxacina	64	16	64	32
	Moxifloxacina	32	32	32	8
Tetraciclina	Tetraciclina	8	0,5	8	8
	Doxiciclina	8	1	4	4
Macrólidos	Eritromicina	16	16	8	2
	Claritromicina	16	16	8	1
Sais Biliares	Colato de sódio	8000	4000	4000	8000
	Desoxicolato de sódio	32000	32000	32000	32000
Biocidas	Clorexidina	2	2	2	2
	Cloreto de benzalcônio	32	16	32	32
	Acriflavina	32	16	32	16

Nota: A negrito estão assinalados os resultados onde houve uma diminuição da CMI

Numa primeira abordagem, e realçando os valores obtidos para a CMI da canamicina verificou-se uma subida da CMI nas estirpes mutantes, isto acontece devido à introdução da cassete de resistência à canamicina na construção do fragmento mutante. Estes resultados confirmam, mais uma vez, a incorporação do fragmento de DNA transformante no DNA genómico de *A. butzleri*, que esteve na origem da construção dos mutantes.

Relativamente à classe dos β-lactâmicos, todos os seus antimicrobianos contêm um anel β-lactâmico que é necessário para a atividade antimicrobiana, sendo que os membros individuais desta família são distinguidos pelas diversas cadeias laterais, que conferem propriedades particulares a cada um deles. Além disso são três os mecanismos que medeiam a resistência a esta

classe de antimicrobianos em *Campylobacter* spp., nomeadamente a inativação enzimática por β -lactamases codificadas cromossomicamente, a redução da captação por alterações nas porinas da membrana externa e a regulação por bombas de efluxo (Iovine 2013). São diversos os estudos que relatam o uso dos β -lactâmicos para infeções intestinais por *Aliarcobacter* spp., no entanto as taxas de resistência em estirpes deste microrganismo podem variar entre 20 a 93,8% em isolados de animais, produtos alimentares, meio ambiente ou amostras humanas (Ferreira et al. 2014; Ferreira et al. 2016; Isidro et al. 2020; Rathlavath, Kohli, Singh, et al. 2017; Shah et al. 2013; Vicente-Martins et al. 2018). Posto isto, e atendendo ao facto que neste trabalho se silenciaram genes que codificam para proteínas do reconhecimento de substratos em sistemas de efluxo, observa-se que todas as bombas de efluxo em estudo, nomeadamente a bomba AreABC, AreDEF e AreGHI têm uma influência na resistência a alguns dos antibióticos desta classe. No entanto é apenas para o mutante AB28/11 Δ areG que se observa uma diminuição da CMI para os quatro antibióticos avaliados nesta classe, em que a ampicilina diminuiu 2 vezes a sua CMI, enquanto que a amoxicilina teve um decréscimo de 4 vezes. Já para a cefalexina e cefotaxima observou-se um acentuado decréscimo na CMI, passando de um caso de resistência na estirpe parental para a suscetibilidade a estes antibióticos no mutante AB28/11 Δ areG. No que diz respeito ao mutante AB28/11 Δ areE verificou-se um decréscimo apenas na CMI para a cefalexina e cefotaxima, com uma redução em 4 vezes e 2 vez, respetivamente. Relativamente ao mutante AB28/11 Δ areB, observa-se uma redução da CMI na cefalexina (10 vezes) e na cefotaxima (10 vezes), enquanto que para a ampicilina e amoxicilina não se verificou alteração na CMI.

Assim, e atendendo aos resultados obtidos pode-se dizer que todas as bombas em estudo têm um papel na resistência aos β -lactâmicos, tal como a bomba CmeABC em *Campylobacter jejuni*, que pela mutagénese insercional do gene *cmeB* levou a um aumento de suscetibilidade de 32 vezes para a ampicilina, enquanto que num outro realizado com o mesmo gene, mas com uma diferente estirpe, o mutante foi apenas 4 vezes mais suscetível à ampicilina em comparação com a estirpe parental (Iovine 2013; Lin et al. 2002; Pumbwe and Piddock 2002).

Outro estudo em *C. jejuni*, após o silenciamento do gene *cmeF*, que codifica para o sistema de efluxo CmeDEF, levou a que a diminuição da CMI fosse apenas de 2 vezes tanto para a ampicilina, como para a cefotaxima (Akiba et al. 2005; Iovine 2013). Portanto, a bomba de efluxo CmeABC em *C. jejuni* tem um papel mais relevante nos β -lactâmicos quando comparado com a bomba CmeDEF, tal como é apontado pelos resultados para a bomba AreGHI em *A. butzleri*.

A mesma bomba de efluxo pode ter impactos diferentes consoante a estirpe, isto é, foi realizado um estudo em *A. butzleri* na bomba de efluxo AreDEF, em que foi relatado um decréscimo da CMI para cefotaxima e cefalexina em *A. butzleri* AB28/11, enquanto que para a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 não se verificou alteração da CMI entre a estirpe mutada e a estirpe parental (Mateus 2019), sugerindo assim que as bombas de efluxo têm diferentes níveis de relevância consoante a estirpe. Apesar dos sistemas de efluxo poderem ter um papel na resistência aos β -lactâmicos, é importante realçar que outros mecanismos podem estar envolvidos. Um estudo realizado em *A.*

butzleri, em que se avaliou o genoma de 49 estirpes, verificou-se uma forte correlação para resistência à ampicilina e a presença de uma β -lactamase semelhante ao OXA-15 β -lactamase (Isidro et al. 2020).

Os aminoglicosídeos são inibidores da síntese de proteínas em organismos de Gram-positivo e Gram-negativo, sendo dois os mecanismos pelos quais esta classe de antibióticos exerce atividade antimicrobiana, nomeadamente a interferência com a translocação da cadeia peptídica, que tem como consequência a terminação prematura desta, e a interferência com a leitura de prova que origina aminoácidos incorretos e proteínas disfuncionais (Hermann 2007). A resistência aos aminoglicosídeos tem sido observada em diversas bactérias de Gram-negativo, sendo detetada pela primeira vez em *C. coli* como sendo mediada por uma 3'-aminoglicosídeo fosfotransferase, codificada por *aphA-3*, que confere resistência à canamicina (Iovine 2013; Lambert et al. 1985). No entanto, no caso de *A. butzleri* desconhece-se o mecanismo de resistência que poderá estar envolvido nesta classe de antibióticos, contudo têm sido reportadas baixas frequências (0,8 - 7,1 %) de resistência aos aminoglicosídeos (Ferreira et al. 2019).

Neste trabalho verificou-se que a CMI da estreptomicina teve um decréscimo mais acentuado para o mutante AB28/11 Δ *areB*, onde se verificou um decréscimo de 8 vezes, quando comparado com a CMI da estirpe parental, enquanto que a gentamicina não baixou para nenhum dos mutantes, sugerindo que nenhuma das bombas de efluxo em estudo tem um papel na resistência a este antimicrobiano. Contudo, Lin et al. (2002) num estudo realizado em *C. jejuni* relativos à bomba de efluxo CmeABC, verificou-se que a CMI decaía duas vezes relativamente à estirpe parental para a gentamicina. Em *A. butzleri*, foi realizado um estudo com a mesma bomba de efluxo, em diversas estirpes, no entanto apenas determinaram a CMI para a gentamicina, ao qual concluíram que o efeito desta bomba de efluxo não é notório para esta classe de antibióticos (Silva 2017).

Relativamente aos valores da CMI para os mutantes AB28/11 Δ *areG* e AB28/11 Δ *areE* para a estreptomicina a diferença é de quatro vezes para a bomba de efluxo AreGHI, e duas vezes para a bomba de efluxo AreDEF, quando comparado com a estirpe parental. Assim, e atendo aos valores da CMI para a gentamicina e estreptomicina na estirpe parental, pode-se presumir que se está perante uma estirpe que é suscetível aos aminoglicosídeos, e por isso o efeito da mutação introduzida possa não ter sido tão evidente. Contudo, há estudos em estirpes de *C. jejuni* de que bombas de efluxo da família RND poderão ter um papel relevante na resistência aos aminoglicosídeos. Isto é, através da construção de mutantes da bomba CmeGH, onde foi deletado o gene *cmeG* em *C. jejuni*, Jeon e seus colaboradores (2011) verificaram um decréscimo de 16 vezes na CMI da gentamicina, valores comparados entre a estirpe mutante e a estirpe parental, presumindo que este sistema de efluxo poderia ter uma relevância na resistência desta estirpe aos aminoglicosídeos (Jeon et al. 2011). No entanto, relativamente a esta classe de antibióticos, continuam a existir dúvidas acerca da contribuição do efluxo para a resistência aos aminoglicosídeos, pensando-se que o efluxo seja menos importante do que as enzimas modificadoras de antibióticos transmitidas por plasmídeos (Iovine 2013).

Relativamente aos fenicóis, nomeadamente o cloranfenicol, foi proposto que a resistência a este antimicrobiano em *A. butzleri* estaria relacionada com a presença do gene *cat*, que codifica uma cloranfenicol *O*- acetiltransferase (Miller et al., 2007). De facto, este é um mecanismo de resistência comum a este antibiótico em bactérias de Gram-negativo e Gram-positivo, visto que a enzima codificada pelo gene *cat*, exerce uma atividade de acetilação no cloranfenicol inativando-o (Murray and Shaw 1997; Roberts and Schwarz 2017). No entanto, sabe-se que para além da presença do gene *cat* também o efluxo de cloranfenicol por via de transportadores específicos associados à membrana, nomeadamente transportadores RND podem ser um mecanismo de resistência deste antibiótico (Butaye, Cloeckert, and Schwarz 2003; Roberts and Schwarz 2017). No que diz respeito ao presente estudo verificou-se que a CMI determinada para o cloranfenicol para as estirpes mutantes AB28/11 Δ *areB* e AB28/11 Δ *areE* não se altera quando comparado com a estirpe parental, o que significa que as bombas AreABC e AreDEF não aparentam ter um papel na resistência a este antibiótico. Estes resultados vão ao encontro de dois estudos diferentes, ambos em *C. jejuni*, em que se demonstra que a bomba CmeABC, da família RND, não tem uma influência no papel à extrusão do cloranfenicol, visto que a diminuição da CMI da estirpe parental para a estirpe mutante foi de duas vezes (Lin et al. 2002; Pumbwe and Piddock 2002). Já considerando os resultados obtidos no presente trabalho para o mutante AB28/11 Δ *areG*, a bomba AreGHI parece demonstrar ter um papel na resistência ao cloranfenicol, pois a CMI teve um decréscimo de quatro vezes em relação à estirpe parental.

As fluoroquinolonas manifestam atividade bactericida contra uma ampla variedade de organismos de Gram-negativo e de Gram-positivo. O ácido nalidíxico é um composto original não fluorado dessa classe de antibióticos, sendo classificado como quinolona. As fluoroquinolonas, nomeadamente a ciprofloxacina, incluem os antibióticos mais comumente usados para o tratamento da diarreia bacteriana aguda (Iovine 2013). Assim, pela análise dos resultados da CMI obtida para os três mutantes e para a estirpe parental, relativamente a esta classe de antibióticos, é de salientar que nenhuma das bombas em estudo têm um papel na resistência ao ácido nalidíxico. Relativamente à ciprofloxacina verifica-se que a bomba AreDEF não apresenta influência na resistência a este antimicrobiano, no entanto, tanto a bomba AreGHI como a bomba AreABC podem ter um papel na resistência à ciprofloxacina, visto que a CMI para o mutante AB28/11 Δ *areG* foi duas vezes menor, e para AB28/11 Δ *areB* foi 4 vezes mais baixa, relativamente à estirpe parental. Um perfil semelhante foi verificado para os antibióticos levofloxacina e moxifloxacina.

Quando considerando os mecanismos de resistência normalmente associados às fluoroquinolonas, em *Campylobacter* spp., estes estão relacionados com a alteração do alvo (geralmente o gene *gyrA*), ou então com o efluxo de antibióticos desencadeado pelos sistemas de efluxo (Iovine 2013). Já em *Arcobacter* spp., a resistência às fluoroquinolonas foi associada a mutações pontuais específicas na região determinante da resistência às quinolonas do gene *gyrA* (Abdelbaqi et al. 2007). Quando não há uma mutação pontual associada ao gene *gyrA*, foi

sugerido que o mecanismo de resistência às quinolonas, nomeadamente às quinolonas hidrofóbicas como é o caso do ácido nalidíxico pode estar relacionado com o nível de captação deste, pelo aumento da impermeabilidade ou pela atividade das bombas de efluxo (Ferreira et al. 2016; Miller et al. 2007). Muito recentemente, e de modo a suportar o que já foi relatado anteriormente, num estudo em que se fez uma análise detalhada do genoma de 49 estirpes de *A. butzleri* foi também associado a resistência às fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) à presença da substituição do Thr-85-Ile em *gryA* (Abdelbaqi et al. 2007; Isidro et al. 2020; Miller et al. 2007). No entanto para o ácido nalidíxico nenhuma associação genótipo-fenótipo pôde ser estabelecida (Isidro et al. 2020). Este estudo aponta para um potencial sinergismo entre dois mecanismos de resistência às fluoroquinolonas, onde o efluxo poderá ter um papel menos relevante.

As tetraciclina são antibióticos inibidores da síntese de proteínas lipofílicas, que provavelmente utilizam uma combinação da via hidrofóbica, bem como porinas da membrana externa para obter acesso ao ribossoma bacteriano. Em *Campylobacter*, os mecanismos de resistência a esta classe de antibióticos são associados à alteração do alvo ribossomal da tetraciclina ou pelo efluxo (Iovine 2013), no entanto, desconhece-se o mecanismo de resistência em *A. butzleri*. A determinação da CMI das tetraciclina foi efetuada usando tetraciclina e doxiciclina, sendo que para o mutante *A. butzleri* AB28/11 Δ *areG* houve uma diminuição de 6 vezes na CMI para a doxiciclina, quando comparada com a estirpe parental. Já para os mutantes *A. butzleri* AB28/11 Δ *areB* E AB28/11 Δ *areE* a CMI apenas baixou 2 vezes. Relativamente à tetraciclina, a CMI teve um decréscimo de 8 vezes apenas para o mutante *A. butzleri* AB28/11 Δ *areG*.

Em *Campylobacter* spp. e outras bactérias de Gram-negativo, a resistência às tetraciclina é conferida por genes de proteção ribossomal, como o *TetO* (Manavathu, Hiratsuka, and Taylor 1988; Salyers, Speer, and Shoemaker 1990), sendo que *TetO* pode ser codificado no cromossoma ou no plasmídeo pTet em *C. jejuni*, e no plasmídeo pCC31 em *C. coli* (Batchelor et al. 2004; Dasti et al. 2007; Iovine 2013; Taylor 1986; Taylor and Courvalin 1988). No entanto, este mecanismo não foi descrito ainda para *A. butzleri*. A contribuição do efluxo pode também ser um mecanismo de resistência a esta classe de antimicrobianos (Iovine 2013). Um exemplo desta contribuição foi descrito pela interrupção ao gene *cmeG*, em *C. jejuni* em que a CMI da estirpe mutante diminuiu 4 vezes em relação à CMI para a estirpe parental (Jeon et al. 2011). Outro exemplo, relativo à bomba de efluxo CmeABC, onde se interrompeu o gene *cmeB*, levou a uma diminuição de 8 a 64 vezes na CMI para a tetraciclina em estirpes mutantes quando comparada com a CMI da estirpe parental (Lin et al. 2002; Gibreel, Wetsch, and Taylor 2007). Outros estudos demonstram ainda que existe uma sinergia quando há a inativação da bomba de efluxo CmeABC e o *TetO*, o que parece indicar que a resistência às tetraciclina resulta de dois mecanismos de resistência. (Gibreel et al. 2007; Lin et al. 2002; Pumbwe and Piddock 2002).

Os macrólidos inibem a síntese de proteínas, ligando-se reversivelmente ao local P na subunidade 50S dos ribossomas bacterianos. Os principais mecanismos de resistência aos macrólidos em

Campylobacter spp. são a modificação do alvo, o efluxo, a alteração da permeabilidade da membrana (Iovine 2013). A modificação enzimática dos macrólidos já foi descrita em bactérias, no entanto nunca foi descrita em *Campylobacter* spp. (Iovine 2013).

A eritromicina e a claritromicina são antimicrobianos pertencentes à classe dos macrólidos, aos quais foram determinados a sua CMI. Para o mutante AB28/11 Δ *areG* verificou-se que não havia alteração da CMI, no entanto para AB28/11 Δ *areE* houve um decréscimo de 2 vezes, quando comparado com a CMI da estirpe parental, para ambos os antibióticos. Já para o mutante AB28/11 Δ *areB* ocorreu um decréscimo de 6 e 8 vezes na CMI da eritromicina e claritromicina, respectivamente. Esta redução vai de encontro ao que foi descrito por Isidro et al., (2020), em que a bomba de efluxo 16 (AreABC) contribuirá para um fenótipo de resistência à eritromicina, devido à existência de modificações num regulador transcricional putativo da Família TetR, que origina a hipótese de que as mutações associadas à codificação de uma proteína truncada levem à sobreexpressão desta bomba, e consequentemente a um aumento da extrusão de eritromicina, que desencadeia a resistência a este antibiótico (Isidro et al. 2020). Em *Campylobacter* spp. a resistência a macrólidos pode ser resultado da modificação do local de ligação ao ribossoma por mutações no 23S rRNA, e por modificações causadas nas proteínas ribossomais L4 e L22. (Bolinger and Kathariou 2017; Cagliero et al. 2006; Caldwell, Wang, and Lin 2008; Kurinčič et al. 2007). Outro mecanismo responsável pela resistência a macrólidos em *Campylobacter*, e que pode atuar em sinergismo com mutações específicas, é o efluxo. A interrupção do gene *cmeB* ou silenciamento do gene *cmeA*, em *C. jejuni* e *C. coli*, levou à inativação da bomba de efluxo CmeABC, indicando que o fenótipo de resistência a macrólidos poderia ser apenas mediado por efluxo deste antibiótico. Contudo existem dados que sugerem que a interação entre a atividade de efluxo da bomba CmeABC e mutações no 23S rRNA contribuem para a resistência a macrólidos em alguns isolados de *Campylobacter* spp. (Cagliero et al. 2006; Jeon and Zhang 2009). Outro estudo que comprova o envolvimento das bombas de efluxo na resistência a esta classe de antimicrobianos em *C. jejuni*, foi descrita pela mutagénese insercional do gene *cmeG*, que teve como consequência a redução da CMI da eritromicina em 8 vezes na estirpe mutante, quando comparado com a estirpe parental (Jeon et al. 2011).

Para além de contribuírem para a resistência a antibióticos, os sistemas de efluxo podem ser responsáveis pela extrusão de outros antimicrobianos como sais biliares ou biocidas. Os sais biliares são produzidos no fígado dos hospedeiros, e uma das suas funções é funcionarem como antimicrobianos naturais, impedindo que as bactérias se disseminem no trato intestinal. No entanto, ao longo dos tempos, estas bactérias podem ganhar resistência aos sais biliares, tal como acontece com os antimicrobianos (Lin et al. 2005; Rosenberg et al. 2003).

O exemplo mais conhecido de uma bactéria entérica é *E. coli* que cohabita no trato intestinal dos hospedeiros, presumindo-se que esta tolere altos níveis de sais biliares e detergentes, que têm como função romper as suas membranas biológicas. Acerca desta bactéria, sabe-se que a sua membrana externa desempenha um papel importante na resistência a estes substratos, no

entanto há outros mecanismos que estão subjacentes a esta resistência, como por exemplo o efluxo de substrato através das bombas de efluxo (Thanassi, Cheng, and Nikaido 1997). Em estudos anteriores, Thanassi, Cheng and Nikaido, (1997) avaliaram se *E. coli* possuía algum mecanismo de efluxo para o bombeamento desses compostos para fora da célula, tendo verificado que após a inativação dos genes *acrAB* e *emrAB* houve uma inibição do crescimento na presença de sais biliares e um aumento da acumulação de quenodesoxicolato no interior da bactéria, sugerindo que o sistema AcrAB de *E. coli* pudesse desempenhar um papel no efluxo de sais biliares (Kumar and Schweizer 2005).

Com o intuito de avaliar se *A. butzleri* possui um mecanismo de efluxo para a sua sobrevivência no trato intestinal dos seus hospedeiros determinou-se a CMI de dois sais biliares, nomeadamente o colato de sódio e o desoxicolato de sódio para a estirpe parental e mutantes, de modo a avaliar o papel desempenhado por cada bomba de efluxo em estudo na tolerância aos sais biliares. Assim, verificou-se que apenas para o mutante AB28/11 Δ *areG* e AB28/11 Δ *areE* se obteve uma diminuição da CMI para o colato de sódio (2 vezes). No caso do desoxicolato de sódio, em nenhum caso se verificou diminuição da CMI, o que indica que o efluxo pode não ser muito relevante na sobrevivência de *A. butzleri* no trato intestinal dos seus hospedeiros.

O primeiro exemplo de que uma bomba da família RND pode funcionar como um exportador de múltiplos antimicrobianos foi apresentado em 1993, com a bomba de efluxo AcrB em *E. coli*, onde foi sugerido que o gene imediatamente a montante de *acrA* estava relacionado com a resistência à acriflavina, isto porque após a inativação da bomba AcrAB verificou-se que a bactéria seria mais suscetível à acriflavina, pois o mutante apresentava valores da CMI mais baixos, quando comparado com a estirpe parental (Ma et al. 1993). Assim, a especificidade de substrato extremamente ampla desta bomba, foi indicada pela inativação do gene *acrAB*, tornando a *E. coli* hipersensível a diversos corantes, detergentes e a diversos antibióticos (Ma et al. 1993; Nikaido 2011).

Atendendo ao facto de haver bombas que podem ter biocidas como substratos, é relevante que se determine a CMI de alguns desinfetantes e germicidas, de forma a avaliar o papel das bombas de efluxo em *A. butzleri* para estes biocidas, neste caso para a clorexidina e o cloreto de benzalcónio. Verificou-se que a CMI da clorexidina não se alterou em nenhum dos mutantes quando comparado com a estirpe parental, pressupondo assim que nenhuma das bombas tem influência na extrusão deste biocida. Já para o cloreto de benzalcónio verificou-se um decréscimo de 2 vezes apenas para o mutante AB28/11 Δ *areG*, o que poderá significar que esta bomba reconhece este desinfetante como substrato. Quanto ao germicida (acriflavina), houve dois mutantes que tiveram um decréscimo de duas vezes na sua CMI, quando comparado com a estirpe parental, sendo estes AB28/11 Δ *areB* e AB28/11 Δ *areG*. Estes dados vão de encontro ao que foi descrito para outros sistemas de efluxo da família RND, como a bomba AcrAB de *E. coli*, sugerindo também aqui o papel das bombas de efluxo de *A. butzleri* na resistência/tolerância a antibióticos, mas também a outros substratos, como biocidas.

Em suma, a avaliação das três bombas de efluxo em estudo do tipo RND, pode-se concluir que as bombas AreABC e AreGHI foram as que demonstraram uma maior influência na extrusão de compostos tóxicos para fora da célula, isto porque foi onde se obtiveram maiores reduções das CMIs das diversas classes de antimicrobianos estudadas. Os resultados obtidos para os mutantes AB28/11 Δ areB e AB28/11 Δ areG, poderão significar que estes sistemas reconhecem uma ampla gama de substratos, conferindo a *A. butzleri* um perfil de multirresistência. Contudo, à semelhança do que já foi reportado noutros estudos, a relevância dos resultados obtidos destas bombas de efluxos na estirpe *A. butzleri* AB28/11, pode não ser igual em outras estirpes desta espécie (Mateus, 2009). Relativamente à bomba de efluxo, AreDEF verificou-se uma seletividade para alguns substratos, no entanto esta não parece desempenhar um papel tão importante na multirresistência de *A. butzleri* AB28/11, tendo o mesmo sido associado anteriormente à virulência da bactéria (Mateus, 2019). Globalmente os sistemas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI contribuem para o perfil de multirresistência da bactéria.

4.4. Ensaios de acumulação de brometo de etídio

De modo a avaliar se as bombas AreABC, AreDEF e AreGHI contribuem para a acumulação de compostos em *A. butzleri*, utilizou-se o brometo de etídio, um fluorocromo e substrato comum de bombas de efluxo, que é normalmente utilizado devido à sua fácil deteção quando se acumula no interior das células (Joux and Lebaron 2000; Martins et al. 2010; Nebe-von Caron, Stephens, and Badley 1998). À medida que o BrEt entra na célula há um consequente aumento da fluorescência, isto acontece devido a um equilíbrio dinâmico entre a difusão passiva para o meio intracelular e o transporte ativo através das bombas de efluxo para o espaço extracelular, no entanto há sempre resíduos deste compostos que permanecem no interior da célula, que se ligam a componentes celulares, tais como DNA e RNA, aumentando a fluorescência da célula (Paixão et al. 2009; Viveiros et al. 2008, 2010).

De modo a avaliar se a interrupção dos genes *areB*, *areE* e *areG*, pode ou não levar a uma alteração na acumulação intracelular do BrEt em *A. butzleri*, foi testada a acumulação de brometo de etídio nesta bactéria.

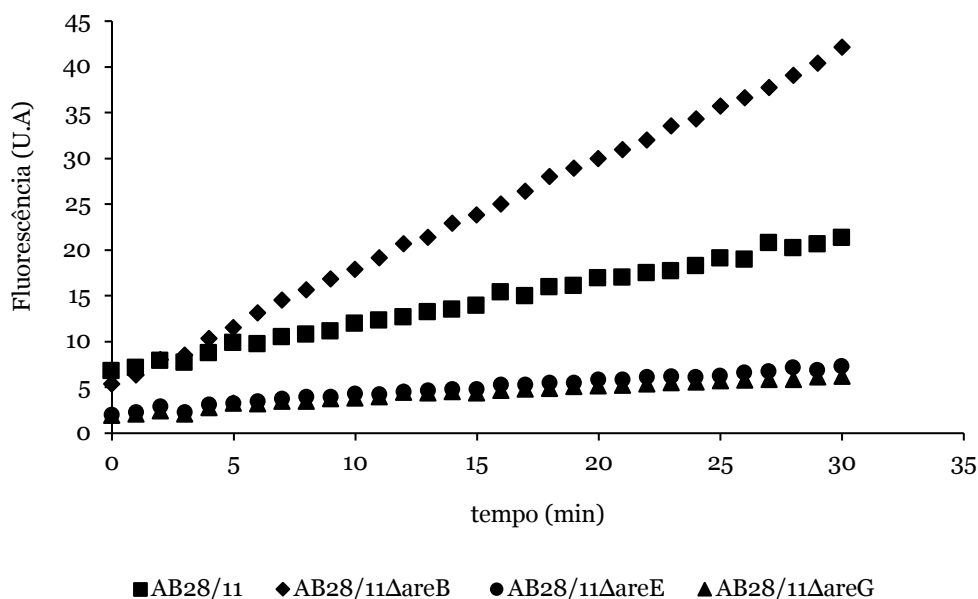


Figura 14 - Acumulação de brometo de etídio pela estirpe parental e as estirpes mutadas na concentração de 1 µg/mL

Pela análise dos resultados obtidos relativos à acumulação do brometo de etídio na estirpe parental e mutantes de *A. butzleri*, apresentados na figura 14, pode-se notar dois fenômenos para as estirpes mutadas. Para AB28/11ΔareB o aumento é superior ao aumento de fluorescência da estirpe parental, o que significa que está a ocorrer uma acumulação superior de BrEt dentro da célula ao longo do tempo. Os resultados observados para a esta estirpe vão ao encontro do que já foi observado em *C. jejuni*, o que confirma que esta bomba, tal como a bomba de CmeABC de *C. jejuni* tem um papel funcional na extrusão do BrEt para o espaço extracelular (Lin et al. 2002; Pumbwe and Piddock 2002). Este fenómeno da acumulação de BrEt após a inativação de um sistema de efluxo também já foi descrito em *A. butzleri* DQ40A1, para esta mesma bomba (AreABC), reforçando assim o seu papel no efluxo de compostos tóxicos para fora da célula (Silva 2017).

O outro fenómeno que acontece nas estirpes mutadas é que apesar de haver um aumento da fluorescência para as estirpes AB28/11ΔareE e AB28/11ΔareG, estas apresentam valores inferiores ao da estirpe parental. Assim, pode-se supor que como o BrEt é um substrato geral para todos os sistemas de efluxo, a deleção destes dois sistemas poderá levar a uma sobreexpressão de outros sistemas que serão responsáveis pela extrusão do composto. Isto vai ao encontro da hipótese proposta por Hassan et al. (2016), que sugere que em estirpes mutadas, onde haja uma hiperatividade de bombas de efluxo que tenham a capacidade de reconhecer o BrEt como substrato, a fluorescência que é consequente da ligação do BrEt aos ácidos nucleicos, localizados no citoplasma da bactéria, esteja abaixo da fluorescência correspondente à da estirpe parental (Hassan et al. 2016).

Perante os resultados obtidos pode-se concluir que a bomba de efluxo AreABC tem um papel relevante no efluxo de *A. butzleri*, dado que pela inativação da bomba ocorre uma diminuição da capacidade da célula em expelir o BrEt. Contudo o mesmo não se verifica para as bombas AreDEF e AreGHI, visto que não houve uma acumulação do BrEt no espaço intracelular, apontando para a necessidade de serem desenvolvidos mais estudos para clarificação deste trabalho.

5. Capítulo - Conclusões

As taxas de resistência a antimicrobianos têm vindo a aumentar ao longo dos anos, o que pode ter como consequência uma intervenção inadequada, ou até mesmo levar à ineficiência na administração de fármacos para o tratamento de infeções. Assim sendo, *A. butzleri* não é exceção a este problema global, no entanto pouco se sabe acerca dos mecanismos de resistência deste microrganismo. Por estudos prévios presume-se que a presença de bombas de efluxo do tipo “*Resistance nodulation cell division*” possa ter um papel importante na multirresistência que este microrganismo patogénico apresenta. Deste modo o presente trabalho focou-se principalmente em avaliar o papel de diversos sistemas de efluxo na resistência a antimicrobianos.

Para tal, este trabalho foi iniciado com a construção do fragmento de DNA transformante da estirpe AB28/11 de *A. butzleri*, através da deleção de diversos genes, nomeadamente os genes *areB*, *areG*, *areLM* e *areN*, que codificam para proteínas de membrana interna de quatro bombas de efluxo diferentes, responsáveis pelo reconhecimento de substratos. No entanto, apenas se conseguiram obter colónias dos mutantes AB28/11 Δ *areB* e AB28/11 Δ *areG*, tendo utilizado também o mutante AB28/11 Δ *areE* previamente construído.

A avaliação do perfil de crescimento da estirpe parental e dos respetivos mutantes (AB28/11 Δ *areB*, AB28/11 Δ *areE* e AB28/11 Δ *areG*) demonstrou que nenhum dos mutantes sofreu uma alteração significativa no seu crescimento, quando comparado com a estirpe parental.

Por avaliação das concentrações mínimas inibitórias de diversos antimicrobianos, quer para a estirpe parental como para os mutantes, verificou-se que os sistemas de efluxo AreABC e AreGHI foram os que maior impacto tiveram, pois, os seus mutantes apresentaram uma maior suscetibilidade a diversas classes de antibióticos. Relativamente ao sistema AreGHI é de evidenciar a relevância que este poderá ter na resistência à classe dos β -lactâmicos, mais precisamente à cefalexina e cefotaxima, pois a sua inativação tornou as estirpes suscetíveis a estes antibióticos. Os resultados também sugerem que a bomba de efluxo AreABC pode ter influência na resistência a estes dois antibióticos. Para além disso verificou-se um decréscimo da CMI da estreptomicina em todos os mutantes, bem como da doxiciclina. Por outro lado, apenas os sistemas de efluxos AreDEF e AreABC demonstram ter um papel na resistência à classe dos macrólidos, sendo que este último foi o que obteve uma maior diferença entre a CMI para a estirpe mutante e a estirpe parental.

Como último ponto deste trabalho, avaliou-se o papel dos diversos sistemas de efluxo na acumulação intracelular de compostos, nomeadamente através de um método de fluorescência que determinou a acumulação de BrEt nas estirpes mutantes e na estirpe parental. Os resultados obtidos permitem concluir que a bomba de efluxo AreABC tem um papel relevante no efluxo de *A. butzleri*, isto porque pela inativação da bomba ocorreu uma acumulação intracelular do BrEt,

apontando para a funcionalidade do sistema. Contudo o mesmo não se verificou para as bombas AreDEF e AreGHI.

Em suma, neste trabalho foi demonstrada a influência dos sistemas de efluxo na multirresistência de *A. butzleri*, sendo os sistemas AreABC e AreGHI os que demonstraram ter maior papel na resistência desta bactéria a diversos antimicrobianos. Contudo mais estudos necessitam de ser realizados de modo a perceber se estas bombas de efluxo têm um papel transversal a todas as estirpes de *A. butzleri* ou apenas à estirpe utilizada neste estudo.

6. Capítulo - Perspetivas futuras

Considerando a importância demonstrada pelas bombas de efluxo da família “*Resistance nodulation cell division*” em *A. butzleri*, nomeadamente as bombas AreABC, AreDEF e AreGHI, poderá especular-se a sua utilidade para novas opções terapêuticas para tratar este agente patogénico. Para isso será necessária uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência, bem como o papel dos diversos sistemas de efluxo na acumulação intracelular de compostos associados às bombas de efluxo, nomeadamente:

- Avaliar se a inativação das bombas de efluxo AreDEF e AreGHI leva a um aumento da expressão de outros sistemas de efluxo;
- Verificar se as proteínas codificadas pelos genes *areN* e *areLM* são essenciais à sobrevivência de *A. butzleri*, através da inativação destas em outros isolados desta espécie;
- Alargar o número de estruturas proteicas “*Resistance nodulation cell division*” a analisar em *A. butzleri*;
- Alargar o número de estirpes para avaliar o efeito das bombas de efluxo;
- Determinar outros mecanismos que possam estar envolvidos em sinergismos com as bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos.

Referências bibliográficas

- Abdelbaqi, K., Ménard A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., and Mégraud, F. (2007) “Nucleotide sequence of the *GyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, pp. 337–345.
- Akiba, M., Lin, J., Barton, Y. W., and Zhang, Q. (2005) “Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter Jejuni*.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, pp. 52–60.
- Alam, M. M., Islam, M., Wahab, A., and Billah, M. (2019) “Antimicrobial resistance crisis and combating approaches.” *Journal Medicine*, 20, pp. 38–45.
- Alav, I., J. Sutton, M., and Rahman, K. M. (2018) “Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, pp. 2003–20.
- Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P., and Martínez, J. L. (2016) “Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence.” *Frontiers in Microbiology*, 7, pp. 1–14.
- Allen, Heather K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, Karen A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010) “Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments.” *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp. 251 – 59.
- Alonso, R., Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Romalde, Jesús L., Figueras, M. José, and Fernandez-Astorga, A. (2020) “*Aliarcobacter vitoriensis* sp. Nov., Isolated from carrot and urban wastewater.” *Systematic and Applied Microbiology*, 43 (4), pp. 1 – 7.
- Batchelor, Roger A., Pearson, Bruce M., Friis, Lorna M., Guerry, P., and Wells, Jerry M. (2004) “Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species.” *Microbiology*, 150, pp. 3507–17.
- Blair, Jessica M. A., Webber, Mark A., Baylay, Alison J., Ogbolu, David O., and Piddock, Laura J. V. (2015) “Molecular mechanisms of antibiotic resistance.” *Nature Reviews Microbiology*, 13, pp. 42–41.
- Blair, Jessica M.A. and Piddock, Laura J. V. (2009) “Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in gram-negative bacteria: an update.” *Current Opinion in Microbiology*, 12, pp.

512–19.

Blanco, P., Corona, F., and Martínez, J. Luis (2019) “Involvement of the RND efflux pump transporter SmeH in the acquisition of resistance to ceftazidime in *Stenotrophomonas maltophilia*.” *Scientific Reports*, 9, pp. 1–14.

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. Antonio, Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. Blanca, and Martinez, J. L. (2016) “Bacterial multidrug efflux pumps : much more than antibiotic resistance determinants.” *Microorganisms*, 4, pp. 1–19.

Bolhuis, H., Van Veen, Hendrik W., Brands, J. Roel, Putman, M., Poolman, B., Driessen, Arnold J. M., and Konings, Wil N. (1996) “Energetics and mechanism of drug transport mediated by the *Lactococcal* multidrug transporter LmrP.” *Journal of Biological Chemistry*, 271 (39), pp. 24123 - 28.

Bolinger, Hannah and Sophia Kathariou. 2017. “The current state of macrolide resistance in *Campylobacter* spp.: trends and impacts of resistance mechanisms.” *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (12), pp. 1–16.

Bonifácio, M. (2018) “Transformação natural em *Arcobacter butzleri*.”, Tese de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., and Schulzke, Jörg-Dieter (2009) “*Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells .” *The Journal of Infectious Diseases*, 200, pp. 756–64.

Butaye, P., Cloeckaert, A, and Schwarz, S. (2003) “Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria.” *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, pp. 205–10.

Cagliero, C., Mouline, C., Cloeckaert, A., and Payot, S. (2006) “Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, pp. 3893–96.

Caldwell, D. Bryson, Wang, Y., and Lin, J. (2008) “Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, pp. 3947–54.

Callbeck, Cameron M., Pelzer, C., Lavik, G., Ferdelman, Timothy G., Graf, Jon S., Vekeman, Bram, S., Harald, L., Sten, F., Bernhard M., Hach, Philipp F., Kalvelage, T., Schmitz, Ruth A., and

- Kuypers, Marcel M. M. (2019) “*Arcobacter peruensis* sp. Nov., a chemolithoheterotroph isolated from sulfide- and organic-rich coastal waters off Peru.” *Applied and Environmental Microbiology*, 85, pp. 1-17.
- Cervenka, L. (2007) “Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect.” *Critical Reviews in Microbiology*, 33, pp. 101–8.
- Chen, I. and Dubnau, D. (2004) “DNA uptake during bacterial transformation.” *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp. 241–49.
- Colclough, Abigail L., Alav, I., Whittle, Emily E., Pugh, Hannah L., Darby, Elizabeth M., Legood, Simon W., McNeil, Helen E., and Blair, Jessica M. A. (2020) “RND efflux pumps in gram-negative bacteria: Regulation, Structure and Role in Antibiotic Resistance.” *Future Microbiology*, 15, pp. 143–57.
- Collado, L., Cleenwerck, I., Trappen, S. V., Des Vos, P., and Figueras, M. J. (2009) “*Arcobacter mytili* sp. Nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from Mussels.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, pp. 1391–96.
- Collado, L. and Figueras, M. J. (2011) “Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*.” *Clinical Microbiology Reviews*, 24, pp. 174–92.
- Collado, L., Guarro, J., and Figueras, M. J. (2009) “Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish.” *Journal of Food Protection*, 72, pp. 1102–6.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., and Figueras, M. J. (2008) “Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution.” *Environmental Microbiology*, 10, pp. 1635–40.
- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, Josep M., and Figueras, M. J. (2010) “Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat river catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant.” *Water Research*, 44, pp. 3696–3702.
- Collado, L., Levican, A., Perez, J., and Figueras, M. J. (2011) “*Arcobacter defluvii* spp. Nov., isolated from sewage samples.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 2155–61.
- Dasti, Javid I., Groß, U., Pohl, S., Lugert, R., Weig, M., and Schmidt-Ott, R. (2007) “Role of the plasmid-encoded *Tet(O)* gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.” *Journal of Medical Microbiology*, 56, pp. 833–37.

Dekker, D., Eibach, D., Boahen, Kennedy G., Akenten, Charity W., Pfeifer, Y., Zautner, Andreas E., Mertens, E., Krumkamp, R., Jaeger, A., Flieger, A., Owusu-Dabo, E., and May, J. (2019) "Fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., and *Arcobacter butzleri* from local and imported poultry meat in Kumasi, Ghana." *Foodborne Pathogens and Disease*, 16, pp. 352–58.

Dhamabutra, N., Kamol-Rathanakul, P., and Pienthaweechai, K. (1992) "Isolation of *Campylobacters* from the canals of Bangkok metropolitan area." *Medical Association of Thailand*, 75, pp. 350–63.

Diéguez, Ana L., Pérez-Cataluña, A., Figueras, M. J., and Romalde, Jesús L. (2018) "*Arcobacter haliotis* Tanaka et Al. 2017 is a later heterotypic synonym of *Arcobacter lekithochrous* Diéguez et Al. 2017." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, pp. 2851–54.

Donachie, Stuart P., Bowman, John P., On, Stephen L. W., and Alam, M.. (2005) "*Arcobacter halophilus* spp. Nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 1271–77.

Doudah, L., De Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., and Houf, K. (2012) "Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* Species isolated." *Journal of Clinical Microbiology*, 50, pp. 735–41.

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, Hendrik W., Pos, Klaas M., Piddock, Laura J. V., and Luisi, Ben F. (2018) "Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation." *Nature Reviews Microbiology*, 16, pp. 523–39.

Eckford, Paul D. W. and Sharom, Frances J. (2009) "ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs." *Chemical Reviews*, 109, pp. 2989–3011.

Fanelli, F., Chieffi, D., Di Pinto, A., Mottola, A., Baruzzi, F., and Fusco, V. (2020) "Phenotype and genomic background of *Arcobacter butzleri* strains and taxogenomic assessment of the Species." *Food Microbiology* 89: 1034-16.

Fath, M. J. and Kolter, R. (1993) "ABC transporters: bacterial exporters." *Microbiological Reviews*, 57, pp. 995–1017.

Fera, M. T., Camera, E. La, Carbone, M., Malara, D., and Pennisi, M. G. (2009) "Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp in southern Italy." *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp. 1661–66.

Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., La Camera, E. , and Carbone, M. (2004) "Detection of *Arcobacter* spp . in the coastal environment of the mediterranean sea." *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp. 1271–76.

Fernandez, H., Villanueva, M. Paz, Mansilla, I., Gonzalez, M., and Latif, F. (2015) "*Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in Southern Chile." *Brazilian Journal of Microbiology*, 147, pp. 145–47.

Fernández, L. and Hancock, Robert E. W. (2012) "Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance." *Clinical Microbiology Reviews*, 25, pp. 661–81.

Ferreira, S., Luís, Â., Oleastro, M., Pereira, L., and Domingues, F. (2019) "A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance." *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, pp. 130–39.

Ferreira, S., Oleastro, M., and Domingues, F. (2017) "*Arcobacter* spp. in food chain-from culture to omics." *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, pp. 73–117.

Ferreira, S., Oleastro, M., and Domingues, F. (2019) "Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain." *Current Opinion in Food Science*, 26, pp. 9–17.

Ferreira, S., Queiroz, João A., Oleastro, M., and Domingues, F. (2014) "Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity." *Microbial Pathogenesis*, 76, pp. 19–25.

Ferreira, S., Queiroz, João A., Oleastro, M., and Domingues, F. (2016) "Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: a review." *Critical Reviews in Microbiology*, 42, pp. 364–83.

Fong, Theng-Theng, Mansfield, Linda S., Wilson, David L., Schwab, David J., Molloy, Stephanie L., and Rose, Joan B. (2007) "Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio." *Environmental Health Perspectives*, 115, pp. 856–64.

Giacometti, F., Serraino, A., Marchetti, G., Bonerba, E., Florio, D., Bonfante, E., Zanoni, R. G., Rosmini, R. (2013) "Isolation of *Arcobacter butzleri* in environmental and food samples collected in industrial and artisanal dairy plants." *Italian Journal of Food Safety*, 2, pp. 121–23.

Gibreel A., Kos, Veronica N., Keelan, M., Trieber, Cathy A., Levesque, S., Michaud, S., and Taylor, Diane E. (2005) "Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype." *Society*, 49, pp. 2753–59.

Gibreel, A., Wetsch, Nicole M., and Taylor, Diane E. (2007) "Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, pp. 3212–16.

Goni, Mohammed D., Muhammad, Ibrahim J., Goje, M., Bitrus, Asinamai A., Jajere, Saleh M., Adam, Babagana M., and Abras, Muhammad A. (2017) "Occurrence of emerging *Arcobacter* in dogs and cats and its public health implications: a review." *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 5, pp. 362–70.

González, A., Morejón, I. F. Bayas, and Ferrús, M. Antonia (2017). "Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain." *Food Microbiology*, 65, pp. 279–83.

González, A. and Ferrús, M. Antonia (2011) "Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods." *International Journal of Food Microbiology*, 145, pp. 311–14.

González, A., Suski, J., and Ferrús, M. Antonia (2010) "Rapid and accurate detection of *Arcobacter* contamination in commercial chicken products and wastewater samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, pp. 327–38.

Hansen, L. Hestbjerg, Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A. Hay, and Sørensen, Søren J. (2004) "Plasmid-Encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4, pp. 3332–37.

Hassan, Karl A., Cain, Amy K., Huang, T., Liu, Q., Elbourne, Liam D. H., Boinett, Christine J., Brzoska, Anthony J., Li, L., Ostrowski, M., Nhu, N. T. Khanh, Nhu, T. Do Hoang, Baker, S., Parkhill, J., and Paulsen, Ian T. (2016) "Fluorescence-Based flow sorting in parallel with transposon insertion site sequencing identifies multidrug efflux systems in *Acinetobacter baumannii*." *MBio*, 7, pp. 1–6.

Hassan, Karl A., Liu, Q., Elbourne, Liam D. H., Ahmad, I., Sharples, D., Naidu, V., Chan, C. L., Li, L., Harborne, Steven P. D., Pokhrel, A., Postis, Vincent L. G., Goldman, A., Henderson, Peter J. F., and Paulsen, Ian T. (2018) "Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in gram-negative pathogens." *Research in Microbiology*, 169, pp. 450–54.

Helling, Robert B., Janes, Brian K., Kimball, H., Tran, T., Bundesmann, M., Check, P., Phelan, D., and Miller, C. (2002) "Toxic waste disposal in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 184, 3699–3703.

Hermann, T. (2007) "Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches."

Cellular and Molecular Life Sciences, 64, pp. 1841–52.

Higgins, C. F. (1992) “ABC transporters: from microorganisms to man.” *Annual Review of Cell Biology*, 8, pp. 67–113.

Hilton, C. L., Mackey, B. M., Hargreaves, A. J., and Forsythe, S. J. (2001) “The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments.” *Journal of Applied Microbiology*, 91, pp. 929–32.

Houf, K., On, Stephen L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S. , and Vandamme, P. (2009) “*Arcobacter thereius* spp. Nov., isolated from pigs and ducks.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, pp. 2599–2604.

Houf, K., On, Stephen L. W., Coenye, T., Mast, J., Hoof, Jan Van, and Vandamme, P. (2005) “*Arcobacter cibarius* spp. Nov., isolated from Broiler Carcasses.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 713–17.

Houf, K., De Smet, S., and Bare, J (2008) “Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*.” *Veterinary Microbiology*, 130, pp. 208–13.

Hsu, T. T. D. and Lee, J. (2015) “Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water.” *Zoonoses and Public Health*, 62, pp. 579–89.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2002) *Microorganisms in Food 7— Microbiological Testing in Food Safety Management*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Iovine, Nicole M. (2013) “Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*.” *Virulence*, 4, pp. 230–40.

Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F., Oleastro, M., Gomes, J. P., and Borges, V. (2020) “Virulence and antibiotic resistance plasticity of *Arcobacter butzleri*: insights on the genomic diversity of an emerging human pathogen.” *Infection, Genetics and Evolution*, 80, pp. 1-40.

Jacob, J., Lior, H., and Feuerpfel, I. (1993) “Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany.” *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, 193, pp. 557–62.

Jeon, B., Wang, Y., Hao, H., Barton, Yi W., and Zhang, Q. (2011) “Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, pp. 79–85.

Jeon, B. and Zhang, Q. (2009) "Sensitization of *Campylobacter jejuni* to fluoroquinolone and macrolide antibiotics by antisense inhibition of the CmeABC multidrug efflux transporter." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63, pp. 946–48.

Jiang, Zhi D., Dupont, Herbert L., Brown, Eric L., Nandy, Ranjan K., Ramamurthy, T., Sinha, A., Ghosh, S., Guin, S., Gurleen, K., Rodrigues, S., Chen, Jacklyn J., McKenzie, R., and Steffen, R. (2010) "Microbial etiology of travelers diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species." *Journal of Clinical Microbiology*, 48, pp. 1417–19.

Joux, F.n and Lebaron, P. (2000) "Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level." *Microbes and Infection*, 2, pp. 1523–35.

Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäuser, U., Glocker, E., Alter, T., and Götz, G. (2013) "Presence of virulence genes , adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*." *Journal of Applied Microbiology*, 115, pp. 583–90.

Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., and Wachsmuth, I. K. (1991) "*Campylobacter butzleri* spp. Nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness." *Journal of Clinical Microbiology*, 29, pp. 376–85.

Kim, H. M., Hwang, C. Y., and Cho, B. C.. 2010. "*Arcobacter marinus* spp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp. 531–36.

Kumar, A. and Schweizer, Herbert P. (2005) "Bacterial resistance to antibiotics : active efflux and reduced uptake." *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 1486–1513.

Kurinčič, M., Botteldoorn, N., Herman, L., and Možina, S. Smole (2007) "Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans." *International Journal of Food Microbiology*, 120, pp. 186–90.

Lambert, T., Gerbaud, G., Trieu-Cuot, P., and Courvalin, P. (1985) "Structural relationship between the genes encoding 3'-Aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in gram-positive cocci." *Annales de l'Institut Pasteur Microbiology*, 136, pp. 135–50.

Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, Stephen J., and Figueras, M. J. (2013) "Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes." *Applied and Environmental Microbiology*, 79, pp. 4951–57.

Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, Ana L., Romalde, Jesús L., and Figueras,

- M. J. (2012) “*Arcobacter bivalviorum* spp. Nov. and *Arcobacter venerupis* spp. Nov., new species isolated from shellfish.” *Systematic and Applied Microbiology*, 35, pp. 133–38.
- Levican, A., Collado, L., and Figueras, M. J. (2013) “*Arcobacter cloacae* spp. Nov. and *Arcobacter suis* spp. Nov., two new species isolated from food and sewage.” *Systematic and Applied Microbiology*, 36, pp. 22–27.
- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L., and Figueras, M. J. (2015) “*Arcobacter ebronensis* spp. Nov. and *Arcobacter aquimarinus* spp. Nov., two new species isolated from marine environment.” *Systematic and Applied Microbiology*, 38, pp. 30–35.
- Li, Y., Zhang, Y., Ding, H., Mei, X., Liu, W., Zeng, J., and Zeng, Z. (2016) “In vitro susceptibility of four antimicrobials against *Riemerella anatipestifer* isolates: A Comparison of Minimum Inhibitory Concentrations and Mutant Prevention Concentrations for Ceftiofur, Cefquinome, Florfenicol, and Tilmicosin.” *BMC Veterinary Research*, 12, pp. 1–8.
- Lin, J., Guo, B., Barton, Yi-Wen, Maurel, Marie-Christine, Payot, S., Zhang, Q., (2005) “Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*.” *Journal of Bacteriology*, 187, pp. 7417–24.
- Lin, J., Michel, L. O., and Zhang, Q. (2002) “CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, pp. 2124–31.
- Lin, J., Yan, M., Sahin, O., Pereira, S., Chang, Yun J., and Zhang, Q. (2007) “Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* Isolates in chickens.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, pp. 1678–86.
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., and Hearst, J. E. (1993) “Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*.” *Journal of Bacteriology*, 175, pp. 6299–6313.
- Mamelli, L., Prouzet-Mauléon, V., Pagès, J. M., Mégraud, F., and Bolla, J. M. (2005) “Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 491–97.
- Manavathu, Elias K., Hiratsuka, K., and Taylor, Diane E. (1988) “Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*.” *Gene*, 62, pp. 17–26.
- Martins, M., Couto, I., Viveiros, M., and Amaral, L. (2010) “Identification of efflux-mediated multi-drug resistance in bacterial clinical isolates by two simple methods.” *Antibiotic Resistance*

Protocols, 642, pp. 181–92.

Mateus, C. L. (2019) “Caracterização funcional de um sistema de bombas de efluxo na virulência e resistência de *Arcobacter butzleri*.”, Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.

Mavri, A. and Možina, S. S. (2012) “Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.” *Journal of Medical Microbiology*, 61, pp. 800–808.

McClung, C. R., Patriquin, D. G., and Davis, R. E. (1983) “*Campylobacter nitrojigilis* spp . Nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spavtina alternijlora* Loisel.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33, pp. 605–12.

McDermott, P. F., Zhao, S., Wagner, D. D., Simjee, S., Walker, R. D., and White, D. (2002) “The food safety perspective of antibiotic resistance.” *Animal Biotechnology*, 13, pp. 71–84.

McMurry, L., Petrucci, R. E., and Levy, S. B. (1980) “Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*.” *National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, pp. 3974–77.

Miller, W. G., Parker, Craig T., Rubenfield, M., Mendz, George L., Wösten, Marc M. S. M., Ussery, David W., Stolz, John F., Binnewies, Tim T., Hallin, Peter F., Wang G., Malek, Joel A., Rogosin, A., Stanker, Larry H., and Mandrell, R. E. (2007) “The complete genome sequence and Analysis of the Epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*.” *PLoS ONE*, 12, pp. 1–21.

Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Vitale, G., Colao, V., Terio, V., Tantillo, G., Figueras, M. J., and Di Pinto, A. (2016) “Occurrence of emerging food-borne pathogenic *Arcobacter* spp isolated from pre-cut (Ready-to-Eat) Vegetables.” *International Journal of Food Microbiology*, 236, pp. 33–37.

Murray, I. A. and Shaw, William V. (1997) “O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, pp. 1–6.

Musmanno, R. A., Russi, M., Lior, H., and Figura, N. (1997) “In vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples.” *New Microbiologica*, 20, pp. 63–68.

Nebe-von Caron, G., Stephens, P., and Badley, R. A. (1998) “Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting.” *Journal of Applied Microbiology*, 84, pp. 988–98.

- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., and Ellis, W. A. (1985) "Taxonomic position of *Campylobacter cryaeoviphila* spp. Nov." *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35, pp. 342–56.
- Nikaido, H. (2011) "Structure and mechanism of RND-Type multidrug efflux pumps." *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 77, pp. 1–60.
- Nishino, K. and Yamaguchi, A. (2001) "Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 183, pp. 5803–12.
- Nurhan, E., Dogruer, Y., Zafer, G., Guner, A., and Ulger, I. (2010) "Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR." *Journal of Food Protection*, 73, pp. 2099–2102.
- On, S. L. W., Stacey, A., and Smyth, J. (1995) "Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia." *Journal of Infection*, pp. 225–27.
- On, S. L. W., Miller, W. G., Kelly, D. J., and Vandamme, P. (2020) "An emended description of *Arcobacter anaerophilus* Sasi Jyothsna et al. 2013: genomic and phenotypic insights." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, pp. 1–3.
- Pacheco, J. O., Alvarez-Ortega, C., Alcalde-Rico, M., and Martínez, J. L. (2017) "Metabolic compensation of fitness costs is a general outcome for antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants overexpressing efflux pumps." *MBio*, 8, pp. 1–13.
- Paixão, L., Rodrigues, L., Couto, I., Martins, M., Fernandes, P., Carvalho, Carla C. C. R., Monteiro, Gabriel A., Sansonetty, F., Amaral, L., and Viveiros, M. (2009) "Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*." *Journal of Biological Engineering*, 3, pp. 1–13.
- Park, S., Taek, Y. J., Kim, S., and Yoon, J. H. (2016) "*Arcobacter acticola* spp. Nov., isolated from seawater on the east sea in South Korea." *Journal of Microbiology*, 54, pp. 655–59.
- Payot, S., Avrain, L., Magras, C., Praud, K., Cloeckert, A., and Chaslus-Dancla, E. (2004) "Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in french poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*." *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, pp. 468–72.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, Ana L., Balboa, S., and Bowman, John P. (2018) "Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter* : getting order from the Chaos." *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1-19.

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, Ana L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, Jesús L., and Figueras, M. J. (2019) “Corrigendum (2): revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the Chaos.” *Frontiers in Microbiology*, 10, pp. 1–2.

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, Ana L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, Jesús L., and Figueras, M. J. (2018) “Corrigendum: revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the Chaos.” *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1–2.

Perez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., and Figueras, M. J. (2019) “*Arcobacter lacus* spp. Nov. and *Arcobacter caeni* spp. Nov., two novel species isolated from reclaimed water.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, pp. 3326–31.

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., and Figueras, M. J. (2018) “*Arcobacter canalis* spp. Nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, pp. 1258–64.

Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., Fernández, M. Del Carmen, Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, María P., and Bou, G. (2012) “Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp. 2084–90.

Petchiappan, A. and Chatterji, D. (2017) “Antibiotic resistance: current perspectives.” *ACS Omega*, 2, pp. 7400–7409.

Peterson, E. and Kaur, P. (2018) “Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens.” *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1–21.

Pianta, C., Passos, Daniel T., Hepp, D., and Oliveira, S. J. (2007) “Isolation of *Arcobacter* spp from the milk of dairy cows in Brazil.” *Ciência Rural, Santa Maria*, 37, pp. 171–74.

Piddock, L. J. V. (2006) “Multidrug-Resistance efflux pumps — not just for resistance.” *Nature Reviews Microbiology*, 4, pp. 629–36.

Pimentel, Z. T. and Zhang, Y. (2018) “Evolution of the natural transformation protein, ComEC, in bacteria.” *Frontiers in Microbiology*, 9, pp. 1–20.

Pizarro-Cerdá, J. and Cossart, P. (2006) “Bacterial adhesion and entry into host cells.” *Cell*, 124, pp. 715–27.

Pumbwe, L. and Piddock, Laura J. V. (2002) "Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump." *FEMS Microbiology Letters*, 206, pp. 185–89.

Radlinski, L. and Conlon, B. P. (2018) "Science direct antibiotic efficacy in the complex infection environment." *Current Opinion in Microbiology*, 42, pp. 19–24.

Rathlavath, S., Kohli, V., Sanjit, A., Lekshmi, M., Tripathi, G., Kumar, S., and Bhusan, B. (2017) "Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment." *International Journal of Food Microbiology*, 263, pp. 32–37.

Rathlavath, S., Kohli, V., Singh, A.S., Lekshmi, M., Tripathi, G., Kumar, S., and Nayak, Binaya B. (2017) "Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment." *International Journal of Food Microbiology*, 263, pp. 32–37.

Rathlavath, S., Kumar, S., and Nayak, Binaya B. (2017) "Comparative isolation and genetic diversity of *Arcobacter* sp. from fish and the coastal environment" *International Journal of Laboratory Hematology*, 38, pp. 42–49.

Roberts, M. C. and Schwarz, S. (2017) "Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms." *Antimicrobial Drug Resistance*, pp. 231–43.

Rosenberg, E. Y., Bertenthal, D., Nilles, M. L., Bertrand, K.P., and Nikaido, H. (2003) "Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with rob regulatory protein." *Molecular Microbiology*, 48, pp. 1609–19.

Rovetto, F., Carlier, A., Van Den Abeele, Anne M., Illegheems, K., Nieuwerburgh, Filip V., Cocolin, L., and Houf, K. (2017) "Characterization of the emerging zoonotic pathogen *Arcobacter thereius* by whole genome sequencing and comparative genomics." *PLoS ONE*, 12, pp. 1–28.

Salas-Massó, N., Andree, Karl B., Furones, M. D., and Figueras, M. J. (2016) "Enhanced recovery of *Arcobacter* spp. using NaCl in culture media and re-assessment of the traits of *Arcobacter marinus* and *Arcobacter halophilus* isolated from marine water and shellfish." *Science of the Total Environment*, 566–567, pp. 1355–61.

Salas-Massó, N., Figueras, M. J., Andree, Karl B., and Furones, M. D. (2018) "Do the *Escherichia coli* european union shellfish safety standards predict the presence of *Arcobacter* spp., a potential zoonotic pathogen?" *Science of the Total Environment*, 624, pp. 1171–79.

Salyers, A. A., Speer, B. S., and Shoemaker, N. B. (1990) "New Perspectives in Tetracycline Resistance." *Molecular Microbiology*, 4, pp. 151–56.

Sasi J., T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C., and Ramana, C. V. (2013) "*Arcobacter anaerophilus* spp. Nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp. 4619–25.

Schweizer, H. P. (1998) "Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, pp. 394–98.

Scullion, R., Harrington, C. S., and Madden, R. H. (2006) "Prevalence of *Arcobacter* spp in raw milk and retail raw meats in northern ireland." *Journal of Food Protection*, 69, pp. 1986–90.

Senka D., Suskovic, J. and Kos, B. (2008) "Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects." *Food Technologic Biotechnology*, 46, pp. 11–21.

Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., and Murugaiyah, M. (2011) "*Arcobacter* - an emerging threat to animals and animal origin food products?" *Trends in Food Science and Technology*, 22, pp. 225–36.

Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B., and Jafri, N. (2013) "Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats." *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, pp. 9–16.

Sharma, A., Gupta, Vivek K., and Pathania, R. (2019) "Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens : from bench to bedside." *Indian Journal of Medical Research*, 149, pp. 129–45.

Silva, A. L. (2017) "A vontribuição de bombas de efluxo para a resistência em *Arcobacter butzleri*.", Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.

De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L. , On, Stephen L. W., Doudah, L., and Houf, K. (2011) "*Arcobacter trophiarum* spp. Nov., isolated from fattening pigs." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 356–61.

Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., and Poole, K. (1998) "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, pp. 65–71.

- Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A., and Rajamohan, G. (2015) "Functional characterization of AbeD, an RND-type membrane transporter in antimicrobial resistance in *Acinetobacter Baumannii*." *PLoS ONE*, 10, pp. 1–17.
- Sulavik, M. C., Houseweart, C., Cramer, C., Jiwani, N., Murgolo, N., Greene, J., Shaw, Karen J. O. Y., Miller, George H., Hare, R., and Shimer, G. (2001) "Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, pp. 1126–36.
- Sun, J., Deng, Z., and Yan, A. (2014) "Biochemical and biophysical research communications bacterial multidrug efflux pumps : mechanisms, physiology and pharmacological exploitations." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, pp. 254–67.
- Talay, F., Molva, C., and Atabay, Halil I. (2016) "Isolation and identification of *Arcobacter* species from environmental and drinking water samples." *Folia Microbiologica*, 61, pp. 479–84.
- Tang, Karen L., Caffrey, Niamh P., Nóbrega, Diego B., Cork, Susan C., Ronksley, Paul E., Barkema, Herman W., Polachek, Alicia J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, James D., and Ghali, William A. (2017) "Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis." *The Lancet Planetary Health*, 1, pp. 316–27.
- Taylor, D. E. (1986) "Plasmid-Mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*: expression in *Escherichia coli* and identification of homology with *Streptococcal* class M determinant." *Journal of Bacteriology*, 165, pp. 1037–39.
- Taylor, D. E. and Courvalin, P. (1988) "Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter* species." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, pp. 1107–12.
- Thanassi, David G., Cheng, Luisa W., and Nikaido, H. (1997) "Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 179, pp. 2512–18.
- Thomas, Christopher M. and Nielsen, Kaare M. (2005) "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria." *Nature Reviews Microbiology*, 3, pp. 711–21.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Etterijck, R. Van, Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., and Lauwers, S. (1992) "Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school." *Journal of Clinical Microbiology*, 30, pp. 2335–37.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J. P., and Goossens, H. (1992)

“Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* Comb. Nov. and *Arcobacter skirrowii* spp. Nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, pp. 344–56.

Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. P., and Vandamme, P. (2004) “*Arcobacter* species in humans.” *Emerging Infectious Diseases*, 10, pp. 1863–67.

Vegge, C. S., Brøndsted, L., Ligowska-Marzeta, M., and Ingmer, H. (2012) “Natural transformation of *Campylobacter jejuni* occurs beyond limits of growth.” *PLoS ONE*, 7, pp. 1-10.

Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Domingues, F., and Ferreira, S. (2018) “*Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: prevalence, genotyping and antibiotics resistance.” *Food Control*, 85, pp. 107–12.

Viveiros, M., Rodrigues L., Martins, M., Couto, I., Spengler, G., Martins, A., and Amaral, L. (2010) “Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system.” *Antibiotic Resistance Protocols*, 642, pp. 181–92.

Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fährnich, E., Kern, Winfried V., and Amaral, L. (2008) “Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method.” *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, pp. 458–62.

Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, Donovan H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, Stefan M., Simon, J., Campbell, Barbara J., Hanson, Thomas E., Woyke, T., Klotz, Martin G., and Hugenholtz, P. (2017) “Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (Phyl. Nov.).” *Frontiers in Microbiology*, 8, pp. 1-19.

Webber, M. A., Bailey, Andrew M., Blair, Jessica M. A., Morgan, E., Stevens, Mark P., Hinton, Jay C. D., Ivens, Al, Wain, John, and Piddock, Laura J. V. (2009) “The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host.” *Journal of Bacteriology*, 191, pp. 4276–85.

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, James T., Xu, R., Topp, E., Arts, Michael T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. André, Lapen, David R., Villemur R., and Khan, Izhar U. H. (2016) “Identification, Characterization and Description of *Arcobacter faecis* spp. Nov., Isolated from a Human Waste Septic Tank.” *Systematic and Applied Microbiology*, 39, pp. 93–99.

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, James T., Xu, R., Topp, E., Arts, Michael T., Chao, J., Adam Z., Lévesque, C. A., Lapen, David R., Villemur, R., Talbot, G., and Khan, Izhar U. H. (2015) “*Arcobacter lanthieri* spp. Nov., isolated from pig and dairy cattle manure.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, pp. 2709–16.

Willey, M., Sherwood, J., M., L., and Christopher, J. W., (2007) *Prescott, Harley, and Klein`s Microbiology*. Seventh Ed. edited by McGraw-Hill Science Engineering. New York.

Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S., and Linz, J. E. (2003) “Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture.” *Microbiology*, 149, pp. 3603–15.

Wong, K., Ma, J., Rothnie, A., Biggin, P. C., and Kerr, I. D. (2014) “Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps.” *Trends in Biochemical Sciences*, 39, pp. 8–16.

Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., and Yildirim, I. H. (2014) “Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* Species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese.” *International Journal of Food Microbiology*, 188, pp. 11–14.

Zambri, M., Cloutier, M., Adam, Z., Lapen, David R., Wilkes, G., Sunohara, M., Topp, E., Talbot, G., and Khan, Izhar U. H. (2019) “Novel virulence , antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*.” *BMC Microbiology*, pp. 1–16.

Zgurskaya, H. I., Rybenkov, V. V, Krishnamoorthy, G., and Leus, I. V. (2018) “Research in microbiology trans-envelope multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria and their synergism with the outer membrane barrier.” *Research in Microbiology*, 169, pp. 351–56.

Zhang, Z., Yu C., Wang X., Yu, S., and Zhang, X. H. (2016) “*Arcobacter pacificus* spp. Nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, pp. 542–47.

Anexo I

Apresentação de parte do presente trabalho nas IV Jornadas de Educação e Investigação em Saúde, realizado no Instituto Politécnico da Guarda, sob a forma de Poster.



CERTIFICADO

Certifica-se que **Ana Nunes, Fernanda Domingues, Mónica Oleastro e Susana Ferrelra** apresentaram um poster com o título «Análise do papel do sistema de efluxo *AreGHI* na resistência de *Arcobacter butzleri*» nas IV Jornadas de Educação e Investigação em Saúde realizadas no dia 12 de dezembro de 2019, na Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda.

Guarda, 12 de dezembro de 2019

A Diretora da Escola Superior de Saúde

(Prof. Paula Pissarra)

A Presidente do Conselho Pedagógico

(Prof. Doutora Ermelinda Marques)

Apresentação de parte do presente trabalho no XV Simpósio Anual do CICS-UBI, realizado na Covilhã, sob a forma de Comunicação Oral.

XV ANNUAL CICS-UBI SYMPOSIUM 2020

1st-2nd October 2020

Scientific Session IV- Microbiology and Drug Research

15:00 – 15:45 – Communications

1. Senior communication

PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF CULTUROMIC BACTERIAL POPULATIONS OF *VACCINIUM MYRTILUS* IN PORTUGAL

José David Flores-Félix, Luis R. Silva, Gilberto Alves

2. Short communication

CHARACTERIZATION OF *ALIARCOBACTER BUTZLERI* EFFLUX PUMP SYSTEMS

Ana Rita Nunes, Cristiana Mateus, Fernanda Domingues, Mónica Oleastro, Susana Ferreira

3. Short communication

DISTRIBUTION OF *CAMPYLOBACTER* SPP. AND *ARCOBACTER SENSU LATO* IN WATER SAMPLES

Igor Venâncio, Mónica Oleastro, Susana Ferreira

XV ANNUAL CICS-UBI SYMPOSIUM 2020

1st-2nd October 2020

22. CHARACTERIZATION OF *ALIARCOBACTER BUTZLERI* EFFLUX PUMP SYSTEMS

Ana Rita Nunes^(*), Cristiana Mateus¹, Fernanda Domingues¹, Mónica Oleastro², Susana Ferreira¹

¹ CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

² National Reference Laboratory for Gastrointestinal Infections, Department of Infectious Diseases, National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(*) Email: anaritalmeidan@hotmail.com

ABSTRACT

Aliarcobacter butzleri is an emerging enteropathogen recognized as the fourth most common species in diarrheal samples among *Campylobacter*-like organisms, being on the list of microorganisms considered to be a serious hazard to human health according to the International Commission on Microbiological Specifications for Food. Resistance to various classes of antibiotics has been reported for *A. butzleri* including even multidrug resistance. Previous studies suggest the presence of a vast repertoire of putative efflux systems, which still need to be characterized, and that may have a relevant role as resistance mechanism to antimicrobials. This work intended to study the role of three systems from the Resistance nodulation cell division efflux pump family (AreABC, AreDEF and AreGHI). Thus, the study started with the construction of mutants by the interruption of the *areB*, *areE* and *areG* genes, followed by the evaluation of the resistance profile of parental and mutant strains to antimicrobials by microdilution method. The results showed that the mutant *A. butzleri* AB28/11Δ*areG* played an important role in the resistance to five of the six classes of antibiotics tested, as well as to several biocides. In contrast, the mutant *A. butzleri* AB28/11Δ*areE* did not play a major role in resistance, while *A. butzleri* AB28/11Δ*areB* was found to have a role in resistance to cephalosporins, streptomycin, fluoroquinolones and macrolides. The reduction in resistance by inactivation of the efflux pumps, as well as their selectivity, points to the role of these pumps in the multidrug resistance profile of *A. butzleri*.

Keywords: *Aliarcobacter butzleri*; RND efflux pumps; Resistance; Antibiotics